

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Lucie Mrázková

IGF2 a preptin, biologicky aktivní peptidy odvozené od pro-IGF2

IGF2 and preptin, biologically active peptides derived from pro-IGF2

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Lenka Žáková, Ph.D.

Praha, 2021

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala především své školitelce RNDr. Lence Žákové, Ph.D. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za pravidelné čtení a opravy mé práce a cenné rady a připomínky. Zároveň musím zmínit své díky také RNDr. Jiřímu Jiráčkovi, CSc. z Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR za poskytnuté pracovní zázemí a všem členům jeho výzkumné skupiny za podporu a tvorbu příjemného pracovního prostředí.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 5. 2021

Lucie Mrázková

Abstrakt

Pro-IGF2 je 156 aminokyselin dlouhý protein a jedná se o prohormon, ze kterého vzniknou dva biologicky aktivní peptidy, IGF2 a preptin.

IGF2 je insulinu podobný růstový faktor 2, který společně s IGF1 a inzulinem sdílí podobnou 3-D strukturu i podobné biologické účinky. Je to peptid, jehož sekvence odpovídá aminokyselinám 1–67 pro-IGF2. Je produkován zejména játry, ale vytváří se ve většině buněk našeho těla. Podílí se na regulaci růstu, diferenciaci, embryogenezi a v posledních letech se zvyšuje zájem o IGF2 zejména kvůli jeho funkci v centrální nervové soustavě.

Preptin je nově izolovaný 34 aminokyselin dlouhý peptid, jehož sekvence odpovídá aminokyselinám 69–102 (E-doméně) pro-IGF2. Preptin ovlivňuje metabolismus glukosy a také homeostázi kostí. Porucha v metabolismu glukózy vede zpravidla k onemocnění diabetes mellitus a porucha v homeostázi kostí vede nejčastěji k osteoporóze. Bylo prokázáno, že preptin zvyšuje druhou fázi sekrece insulinu a má pozitivní vliv na proliferaci a diferenciaci osteoblastů, kostních buněk podporujících růst kostí.

Klíčová slova:

pro-IGF2, preptin, IGF2, E-doména, genová exprese, imprinting *IGF2*

Abstract

Pro-IGF2 is a 156 amino acid long protein and it is a prohormone from which two biologically active peptides are formed, IGF2 and preptin.

IGF2 is an insulin-like growth factor 2 that, together with IGF1 and insulin, shares a similar 3-D structure and similar biological effects. It is a peptide whose sequence corresponds to amino acids 1–67 of pro-IGF2. It is produced mainly by the liver, but it is formed in most cells of our body. It is involved in the regulation of growth, differentiation, embryogenesis and in recent years the interest in IGF2 has been increasing mainly due to its function in the central nervous system.

Preptin is a newly isolated 34 amino acid long peptide whose sequence corresponds to amino acids 69–102 (E-domain) of pro-IGF2. Preptin affects glucose metabolism as well as bone homeostasis. Disorders in glucose metabolism usually lead to diabetes mellitus, and disorders in bone homeostasis most often lead to osteoporosis. Preptin has been shown to increase the second phase of insulin secretion and to have a positive effect on the proliferation and differentiation of osteoblasts, bone cells promoting bone growth.

Keywords:

pro-IGF2, preptin, IGF2, E-domain, gene expression, imprinting *IGF2*

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Peptidy inzulínové rodiny	2
3	IGF2.....	4
3.1	Gen.....	5
3.1.1	Imprinting	8
3.2	Pre-pro-IGF2	10
3.3	Pro-IGF2	10
3.4	Fyziologické účinky	12
3.4.1	Vazba na IGF2R	13
3.4.2	Vazba na HI	14
3.4.3	Vazba na IGF1R	14
4	IGF2BP	15
5	Preptin	17
5.1	Struktura a vznik	17
5.2	Fyziologické účinky	18
5.3	Analogy preptinu.....	19
5.3.1	Záměna aminokyselin.....	20
5.3.2	Cyklické preptiny	21
6	Závěr a diskuze	22
7	Seznam zkratk a symbolů	25
8	Přehled literatury	26

1 Úvod

Pro-IGF2 je prekurzor (tzv. prohormon) inzulínu podobného růstového faktoru 2. V těle člověka a dalších živých organismů (hlodavců i dalších savců) vznikají z tohoto proteinu dva biologicky aktivní peptidy. IGF2 (inzulínu podobný růstový faktor 2) je růstovým faktorem z rodiny inzulínu, který kontroluje (jako jeden z mnoha) správnost vývoje plodu a embrya, ale jeho významná hladina putuje také v krevním řečišti dospělých jedinců. Jako každý růstový faktor má i IGF2 potenciál podporovat rakovinná bujení. Druhým důležitým peptidem odvozeným z pro-IGF2 je relativně nedávno (oproti inzulínu a IGF2) objevený preptin, jehož přesná fyziologická funkce zatím není známa, ale zdá se, že tento peptid má určitý biologický potenciál.

Exprese i fyziologické účinky IGF2 a preptinu jsou dnes stále předmětem zájmu mnoha vědeckých skupin. I když od objevu pro-IGF2 uplynula již řada let, stále některé mechanismy zůstávají utajeny a to nám brání v celkovém pochopení fungování obou biologicky aktivních peptidů.

Cílem této práce proto bylo shrnout aktuální poznatky publikované v souvislosti s pro-IGF2, IGF2 a preptinem a pokusit se dokázat, že jejich výzkum má potenciál ať už v souvislosti s potenciální léčbou nejen nádorových a růstových onemocnění, nebo v pochopení molekulárních mechanismů některých málo probádaných procesů, které jsou běžnou součástí živých organismů a jejich vývoje.

2 Peptidy inzulínové rodiny

Inzulín je pankreatický hormon, který se účastní homeostáze glukózy v lidském těle. Inzulín či hormony s podobnou funkcí a strukturou najdeme u obratlovců, bezobratlých i jednobuněčných eukaryot (např. protozoí rodu *Tetrahymena* i hub *Neurospora crassa* a *Aspergillus fumigatus*). Inzulín reguluje množství nízkomolekulárních látek (sacharidů, aminokyselin, iontů apod.), které se uvolňují z buněk do zbytku těla (1). U vyšších obratlovců má velice konzervovanou strukturu a je sekretován slinivkou břišní (β -buňkami Langerhansových ostrůvků), která ho skladuje v granulích spolu s dalšími endokrinními proteiny a sekretuje do krve. U některých organismů vytváří dimery u jiných i hexamery asociované se zinečnatými kationty (2). Inzulín vzniká z prekursoru proinzulínu odštěpením C a D domény. Výsledný protein obsahuje dva samostatné řetězce A a B (z původních domén A a B) a vytváří 3 disulfidické můstky (3, 4).

V živých organismech nacházíme také inzulínu strukturně podobné proteiny, které mají často zcela odlišné účinky. Z toho plyne jejich možná evoluční souvislost a díky tomu je řadíme mezi hormony inzulínové rodiny. Patří sem inzulín, inzulínu podobné růstové faktory (IGF), relaxiny a inzulínu podobné peptidy (INSL peptidy) (2).

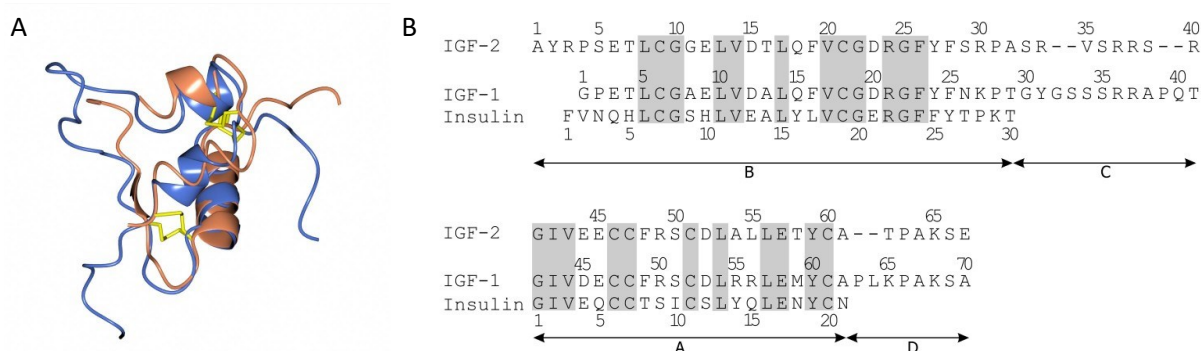
Mezi relaxinové peptidy řadíme relaxiny 1–3 a INSL peptidy 3–6. Najdeme je u všech savců. Mají svoje vlastní receptory, které jsou receptory asociované s G-proteinem a spouští signalizační kaskádu cAMP (5, 6).

Relaxiny jsou inzulínu nejpodobnější na úrovni vyšších struktur, protože obsahují pouze A a B řetězce, které mají Cys na stejných pozicích jako inzulín, a to umožňuje i tvorbu stejných disulfidických můstků, což bylo dokázáno roku 1977 (7–9). Ač má vysokou strukturní podobnost s inzulínem, po sbalení se povrchy obou peptidů velice liší, protože relaxin obsahuje jiné aminokyselinové zbytky ve svém centru. Z toho důvodu se relaxin neváže na inzulínové ani IGF receptory a má odlišnou funkci (2). Fyziologickými funkcemi relaxinu je hlavně regulace reprodukčních orgánů a vazodilatace, regulace činnosti ledvin nebo nervového systému. Relaxin najdeme v reprodukčních orgánech, jako jsou prostata, žluté tělísko, děloha, varlata a další. Zvětšuje roztažnost dělohy a k ní přiléhajících oblastí. U mužů reguluje činnost prostaty a tvorbu akrozómu u spermatozoí (potlačuje apoptózu a podporuje tvorbu mitochondrií) (5, 10).

Spolu s rostoucími možnostmi technologií sekvenace se zjistilo, že kromě relaxinů spadají do relaxinové rodiny také INSL peptidy, které jsou kódovány vlastními geny. Existují čtyři různé INSL (INSL 3–6), jejich geny mají podobnou strukturu a expresí vytváří obdobné prepropeptidy. I těmto peptidům po dokončení processingu zůstávají pouze domény A a B, které jsou navzájem propojeny dvěma disulfidickými můstky a obsahují jeden intramolekulární S-S

můstek. INSL peptidy se u člověka nacházejí v pohlavních orgánech mužů i žen, kde regulují jejich činnost a sekreci pohlavních hormonů, obdobně jako relaxiny. Jejich další funkce zatím nejsou zcela objasněné, ale mohly by mít vliv také na osteogenezi, metabolismus glukózy a tuků. Vazba na konkrétní receptory ještě nebyla dostatečně prozkoumána (11).

Již od roku 1957 se předpokládalo, že existují v živých organismech (hlavně u vyšších obratlovců) proteiny, které zprostředkovávají účinky hormonů hypofýzy na kosterní tkáň a podporují její růst. Další zkoumání prokázalo, že existují alespoň dva různé hormony, které zprostředkovávají signály pro vývoj chrupavek (12). Později se zjistilo, že tyto hormony mají vysokou sekvenční i strukturní homologii s proinzulínem (cca 50 %, Obrázek 1), a proto byly pojmenovány jako inzulínu podobné růstové faktory 1 a 2 (IGF1, IGF2) (13–15). Na rozdíl od inzulínu nejsou IGF skladovány v pankreatických β -buňkách, ale jsou ihned po syntéze vylévány do krve (koncentrace 20 nM IGF1 a 80 nM IGF2) (16).



Obrázek 1 Srovnání struktur IGF1, IGF2 a inzulínu. **(A)** Srovnání terciární struktury. Modře vyznačen IGF2, oranžová znázorňuje inzulín. Žlutá barva zdůrazňuje odlišné aminokyselinové zbytky. **(B)** Porovnání primárních struktur IGF2, IGF1 a inzulínu s označením jejich domén. Šedá barva značí oblasti, které jsou shodné u všech tří proteinů. Šipky pod sekvencemi ohraničují domény B, D, A, C.

Gen *IGF1* je větší než gen *IGF2* a oba se u člověka vyskytují v jedné kopii a mají podobné uspořádání intronů a exonů. (17). Expresi genu *IGF1* započne v játrech růstový hormon (GH) navázaný na svůj receptor. Hotový syntetizovaný protein IGF1, slouží jako prostředník GH v endokrinním předávání informací ke tkáním těla, které začnou proliferovat (18, 19). IGF1 účinkuje nejspíš ve všech tkáních těla. Největší význam má při embryonálním vývoji, ale i po narození se účastní regulace růstu organismu a v hypofýze zastavuje produkci GH (19).

3 IGF2

IGF2 (díky svým účinkům také zvaný somatomedin A (18, 20)) byl objeven roku 1972 izolací z krve telat (21). Z lidské krve byl izolován roku 1978 (14). Proteiny s obdobnou strukturou i funkcí jako má lidský IGF2 nacházíme u všech obratlovců a některých bezobratlých (např. u *Drosophila melanogaster*). U každého druhu se mírně liší v důsledku alternativního sestřihu a imprintingu genu *IGF2* – shrnuto v (22, 23).

Jako první stanovili sekvenci lidského IGF2 pánové Rinderknecht a Humbel roku 1978 (14). Vyšší strukturní motivy analyzovali užitím rentgenové krystalografie i NMR (15, 24, 25).

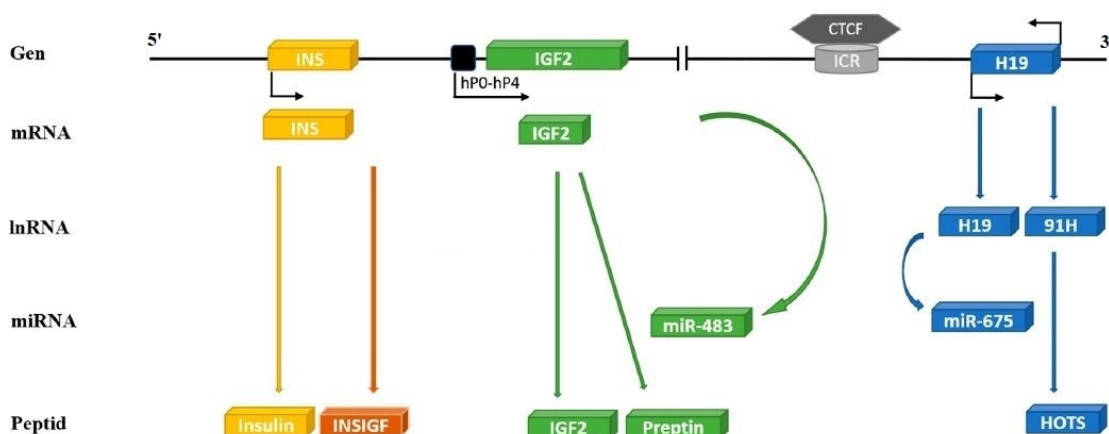
Maturovaný lidský IGF2 má 67 aminokyselin a je 7,5 kDa velký. Skládá ze 4 domén: B-C-A-D. Terciární struktura sestává ze tří α -helixů a protein obsahuje tři disulfidické můstky (26). Myši a potkaní prepro-IGF2 je s lidským homologní z 83,9 % a 85 % a jejich terciární struktura je obdobná. U koně (*Equus caballus*) je homologie s lidským pre-prohormonem 83,4 % (*UniProt* + *UniProt Align* [online]. [cit. 2021-03-07]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/>). S *Danio rerio* (UniProt kód Q9PUD0) IGF2 je lidský homologní na 41 % stejně jako pstruh duhový (*Oncorhynchus mykiss*, kód Q02816) sdílí 41% homologii, šimpanz bonobo (*Pan paniscus*, kód A0A2R9B770) 76,3% a tur domácí (*Bos taurus*, kód P07456) je homologní s lidským IGF2 z 82,8 %. Všechna data jsou vztažena k lidskému IGF2 (kód P01344) (*UniProt* + *UniProt Align* [online]. [cit. 2021-04-20]. Dostupné z: <https://www.uniprot.org/>) (27).

	10	30	50	70
<i>Mus musculus</i>	MGIPVGKSM L VLLISLAFAL	CCIAAYGPGE TLGGELVDT	LQFVCSDRGF YFSRPSSRAN	RRSRGIVEEC
<i>Rattus norvegicus</i>	MGIPVGKSM L VLLISLAFAL	CCIAAYRPSE TLGGELVDT	LQFVCSDRGF YFSRPSSRAN	RRSRGIVEEC
<i>Homo sapiens</i>	MGIPMGKSM L VLLTFLAFAS	CCIAAYRPSE TLGGELVDT	LQFVCGDRGF YFSRPASRVS	RRSRGIVEEC
	80	100	120	140
<i>Mus musculus</i>	CFRSCDLALL ETYCATPAKS	ERDVSTSQAV LPDDFPRYPV	GKFFQYDTWR QSAGRLRRGL	PALLRARRGR
<i>Rattus norvegicus</i>	CFRSCDLALL ETYCATPAKS	ERDVSTSQAV LPDDFPRYPV	GKFFKFDTWR QSAGRLRRGL	PALLRARRGR
<i>Homo sapiens</i>	CFRSCDLALL ETYCATPAKS	ERDVSTPPTV LPDNFPRYPV	GKFFQYDTWK QSTQRLRRGL	PALLRARRGH
	150	170	180	
<i>Mus musculus</i>	MLAKELKEFR EAKRHRPLIV	LPPKDPAHGG ASSEMSSNHQ		
<i>Rattus norvegicus</i>	MLAKELEAFR EAKRHRPLIV	LPPKDPAHGG ASSEMSSNHQ		
<i>Homo sapiens</i>	VLAKLEAFR EAKRHRPLIA	LPTQDPAHGG APPEMASNRK		

Obrázek 2 Srovnání sekvence prepro-IGF2 u myši (*Mus musculus*), potkana (*Rattus norvegicus*) a u člověka (*Homo sapiens*). Tučně je zvýrazněna sekvence IGF2. Prvních 24 aminokyselin je signální peptid. Modrá barva značí shodné aminokyseliny všech tří druhů. Vytvořeno za pomoci programu UniProt [06-03-2021].

3.1 Gen

Gen *IGF2* se u člověka nachází na chromozómu 11p15 (28–30). V jeho nejbližším okolí se nachází upstream (tj. ve směru 5', protisměru transkripce) stejně orientovaný gen pro inzulin (*INS*) a na opačnou stranu (downstream neboli 3', též ve směru transkripce) sousedí s neprotei-nogenním tumor supresorovým genem *H19*, který může být přepisován ve stejném směru, ale také v antisense orientaci než oba výše zmíněné geny (Obrázek 3) (17, 31). Jedná se o gen velikosti cca 30 kbp, který obsahuje 9 exonů (kódujících oblastí) a 5 promotorů. Samotný protein pro-IGF2 je však kódován pouze exony 7, 8 a částí exonu 9, které obsahují také 5'UTR (5'-nepřekládaná oblast). Exony 1 až 6 jsou nekódující sekvence, které slouží např. k alternativnímu sestřihu a následně hlavně k regulaci genové exprese. Také mohou dát vzniknout regulačním miRNA (mikro RNA) (Obrázek 3). Regulace genové exprese se uplatňuje během vývoje jedince několikrát a v každé fázi vývoje jsou využity jiné promotory a navíc se exprese liší i mezi tkáněmi těla (17, 32–35).



Obrázek 3 Uspořádání lidských genů pro inzulin (*INS*), *IGF2* a *H19* v jednom klastru na chromozomu 11. Z *INS* vzniká expresí z jednoho promotoru protein inzulin, *IGF2* (5 různých promotorů) dává vzniknout peptidům IGF2 a preptinu, ale také regulační miRNA (miR-483). Na ICR (imprinting kontrolující oblast) nasedá regulační faktor CTCF, který ovlivňuje genovou expresi *IGF2* i *H19* podle alely původu. Z *H19* vznikají dvě různé mRNA (podle směru transkripce snese nebo antisense), které kontrolují expresi dalších genů nebo jsou dále upraveny a vznikají miR-675 a HOTS. lncRNA – dlouhá nekódující RNA (z angl. long non-coding RNA); miRNA – mikro RNA; HOTS – *H19* opačný tumor supresorový gen (z angl. *H19* opposite tumor suppressor). Převzato a upraveno z (35).

První objevy potvrdili hypotézu, že exprese *IGF2* probíhá ze 4 promotorů (u člověka, myši i potkana) a to promotorů P1 až P4 u člověka, respektive P0–P3 u myši. Promotory však měly u myši jiné sekvence a umístění na chromozómu než u člověka (Obrázek 4) (12, 33, 36). V roce 2006 bylo prokázáno, že u člověka je přítomen ještě jeden promotor „navíc“ oproti myši a

potkanovi (Obrázek 4). Promotor se u člověka značí P0 a nachází se před exonem 2 (37). Každý promotor je aktivní v různých tkáních těla v různých fázích ontogeneze člověka (38).

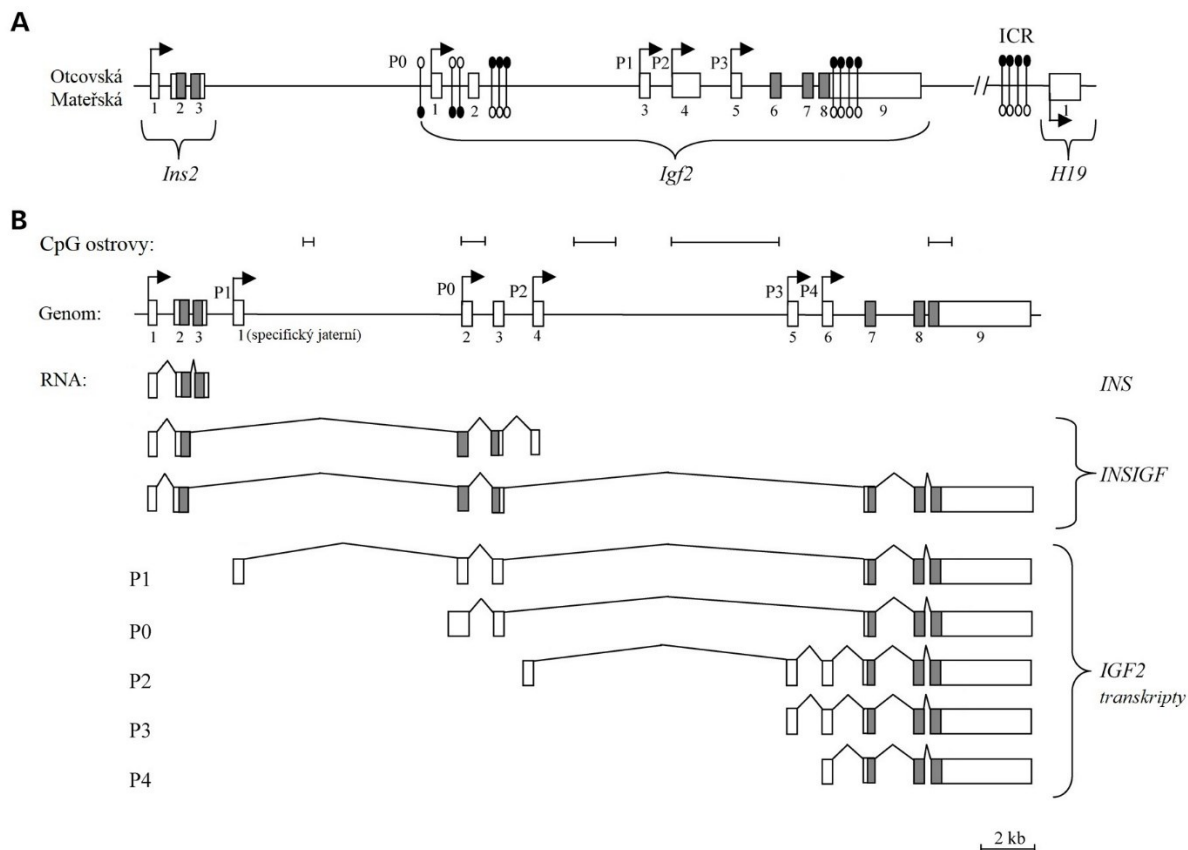
Promotory P3 a P4 jsou aktivní po celou dobu vývoje plodu a v menší míře také u dospělých jedinců téměř ve všech tkáních. V játrech dospělého člověka se uplatňuje specifická exprese z promotoru P1 a promotory P2 až P4 jsou zcela neaktivní. P1 se nachází před exonem 1, downstream poblíž *INS* genu. Je zcela unikátní pro člověka a jako jediný zahrnuje do transkriptu také netranslatované exony 1, 2 a 3 (38–40). Dalším specifikem P1 je absence imprintingu. V játrech dochází k expresi tohoto genu z alel od obou rodičů (39). U promotoru P2 zatím neznáme přesnou aktivitu ani funkci, ale víme, že exprese přes něj neprobíhá v Hep3B a HeLa buňkách – jaterní a epiteliální děložní tkáň vyvinutých jedinců. Naopak P2 je plně funkční v prenatální jaterní tkáni, v ostatních orgánech a v menší míře u dospělých jedinců. Na aktivní promotory se váží jaderné proteiny (33). Analýzou promotorů se již zabývalo mnoho výzkumných skupin (33, 37, 38, 40). Promotor P0 se u člověka nachází před exonem 2, zatímco u myši žádný promotor na tomto místě není. Lidský P0 je aktivní ve všech tkáních plodu, vyjma embryonální slinivky břišní, a placentě matky. Velké množství *IGF2*-P0 transkriptu se nachází v kosterní svalovině plodu – v pozdějším vývoji u dospělých jedinců jsou tyto transkripty přítomny (vyjma mozku) pouze v malé míře (37). Umístění promotorů na DNA, přepisované transkripty a jejich porovnání u myši a člověka znázorňuje Obrázek 4.

Expresa *IGF2* podléhá také účinkům enhanceru, který se nachází 5–6,5 kbp downstream od polyadenylačního místa *H19* (41–43).

Kromě exprese z výše zmíněných pěti promotorů může u člověka vznikat i produkt *INSIGF* transkripce. V takovém případě probíhá exprese genu z *INS* promotoru a (protože *IGF2* je v těsné návaznosti na *INS*, (17)) rovnou exprimuje také *IGF2*. Při této formě transkripce může vzniknout neúplný *IGF2* transkript (po pouze 2 exonech *INS* následují exony 2, 3 a 4 *IGF2*) nebo téměř úplný transkript, ve kterém schází *INS* genu exon 3 a *IGF2* exony 1, 4, 5 a 6 (Obrázek 4). Obě tyto varianty byly izolovány z organismu *in vivo* (37).

U myši (*Mus musculus*) se gen *Igf2* nachází na chromozómu 7 (44, 45). Gen má 4 promotory a 9 exonů. Na rozdíl od lidského *IGF2* není v těsné návaznosti na *INS* gen. Exon 1 začíná až cca 5 kbp downstream od *Ins*. Na 5' *Igf2* exonu 9 následuje i u myši *H19* (37, 46). Myší promotor P0 (značený někdy také mP0) se nachází na stejném místě jako lidský P0 a má stejnou strukturu, ale je exprimován výhradně v placentě. Na rozdíl od lidského P0 myší P0 nepodléhá v placentě imprintingu (je methylován na obou alelách stejně). Aktivita tohoto promotoru souvisí s přítomností či absencí genu *H19*. To je v kontrastu s ostatními promotory, které nejsou

na (ne)přítomnosti *H19* závislé. Tato závislost P0 na *H19* by mohla zdůvodňovat rozdílnou expresi *Igf2* v různých tkáních (46–48).



Obrázek 4 Srovnání struktury genu *Igf2* (myš, obr. A) a *IGF2* (člověk, B) a umístění jejich promotorů. Šedá barva značí protein kódující exony. Vzdálenosti odpovídají měřítku uvedenému ve spodním okraji obrázku. (A) Rozdíly v otcovské a mateřské alele chromozómu 7 u myši. Vybarvená kolečka značí methylovaná místa, prázdná místa udávají nemethylovaná místa. Šipky znázorňují umístění promotorů a směr transkripce. Ve většině tkání je aktivní exprese *Igf2* z otcovské alely (maternální imprinting) a *H19* z mateřské. Promotor P1 je aktivní specificky v játrech. (B) Schematické znázornění umístění lidských *INS* a *IGF2* genů a jejich promotorů na chromozómu 11. Šipky v genomovém diagramu značí umístění promotorů. Z genů vzniká prepisem několik různých transkriptů znázorněných v obrázku. Přeloženo a upraveno podle (37).

Potkan (*Rattus norvegicus*) má gen *Igf2* na chromozómu 1 vedle genu pro inzulin a také sousedí s *H19* (49). Uspořádání je velice podobné myšimu genu.

Kromě exprese z různých promotorů má *IGF2* další specifikum, kterým je maternální imprinting. Maternální imprinting (tzn. mateřská alela genu je umlčena a exprese probíhá jen z otcovské alely) se vyskytuje u člověka (50), u myši (44, 51) i např. turu domácího (*Bos taurus*) (52). Naopak imprinting neprobíhá u ryb, což potvrzuje teorii, že gen je imprintován pouze u placentálních živočichů (53).

3.1.1 Imprinting

Gen *Igf2* je u myši maternálně imprintován. Imprinting se vyskytuje u embryonálního vývoje stejně jako u narozených jedinců a dospělců. Mateřská alela je však exprimovaná spolu s otcovskou v exkluzivních orgánech, jako je choroidní plexus (a k němu přiléhající měkké pleny mozkové) nebo v nádorem napadených tkáních. Mutanti s umlčenou otcovskou alelou jsou menší než nemutovaní jedinci. Heterozygoti dorůstají obvyklých velikostí (44). Objev imprintingu genu *Igf2* u myši (44) byl prvním přímým (genetickým i molekulárním) důkazem imprintingu savčího genu.

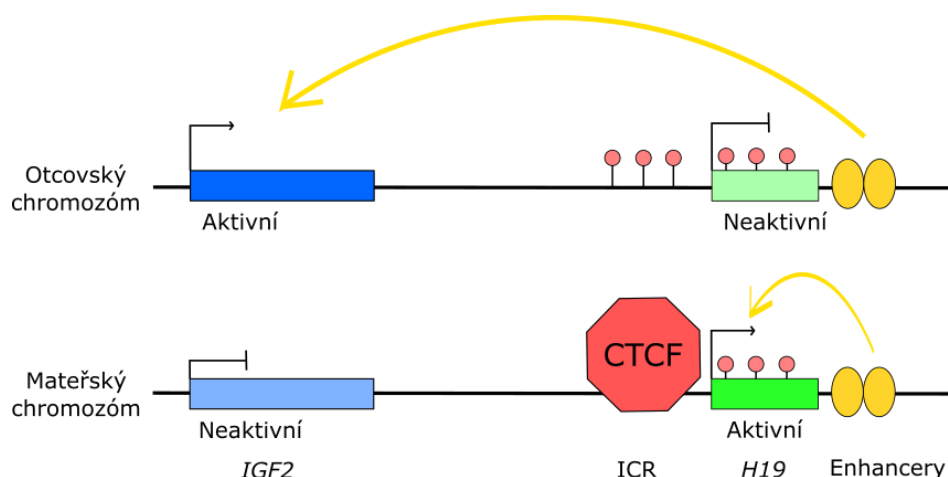
U člověka je *IGF2* gen také exprimován většinou z otcovské alely. Najdeme však orgány, které v průběhu svého vývoje mění expresi a mohou produkovat IGF2 z obou rodičovských alel. Maternální imprinting se uplatňuje u novorozence ve žlučníku, slinivce, štítné žláze, brzlíku, nadledvinách i v buňkách srdeční i kosterní svaloviny. Naopak obě alely jsou exprimovány v choroidním plexu a mozkových plenách (39, 50). Tato zjištění odpovídají poznatkům známých z myšího genu (39, 44). Dospělí jedinci exprimují pouze otcovskou alelu *IGF2* v placentě, ledvinách a dalších tkáních těla. Absence imprintingu je charakteristická pro plně vyvinutá játra a choroidní plexus (50).

Ztráta imprintingu (a tedy exprese *IGF2* z obou alel) je velice častá v *IGF2* dependentních nádorových tkáních a u dalších onemocnění jako je např. Beckwith-Wiedemannův syndrom a Wilmsův nádor (54).

Rodičovský imprinting je obvykle způsoben methylocí na chromozómu. Obzvlášť důležitá je CpG methylace využívající 5' UTR (44, 55, 56). Přesný mechanismus imprintingu *IGF2* zůstal dlouho skryt. Předpokládalo se, že je způsoben alelově-specifickými methylacemi v 5' UTR někde mezi promotory P1 a P2 a expresí z P1 není odstraněn, protože může docházet také k částečnému nebo opožděnému imprintingu (32). Tuto domněnku také podporovala data prokazující, že tkáně, které exprimují obě alely tohoto genu, mají aktivní promotor P1, a tkáně, ve kterých jsou aktivní zbylé promotory P2–P4 exprimují pouze otcovskou alelu genu (32, 39). U myši a potkana však chybí promotor P1 a i přesto nacházíme tkáňově specifický imprinting stejný jako u člověka (44, 51, 57). Před prvním myším promotorem však byly objeveny methylace, které se liší podle rodičovského původu alely (58). To ukazovalo na možný původ imprintingu a mohlo být signifikantním důkazem, že ještě neznáme všechny myší promotory a imprinting u myši by mohl probíhat totožně jako u člověka.

Dnes se již přikláníme k názoru, že imprinting genu *IGF2* je způsoben epigenetickým mechanismem vazby regulačního faktoru CTCF (z *angl.* CCCTC-binding factor) do konkrétního místa na chromozómu downstream od *IGF2* zvaném ICR (z *angl.* imprinting-control region).

ICR se nachází několik kbp 5' (upstream) od H19 a vykazuje odlišné methylace podle alely původu. ICR je methylováno na otcovské alele genu a nemethylováno na alele od matky. CTCF je schopný se vázat pouze na nemethylované ICR = mateřská alela (Obrázek 5). CTCF potom vytváří chromatinovou smyčku interakcí v dalšími DNA-vazebnými proteiny a tím blokuje expresi mateřského IGF2. Bližší popis souvislosti umlčování genu IGF2 s umlčováním genu H19 viz níže v této kapitole. (31, 42, 59, 60). Stejný mechanismus byl nalezen i u myši (46).



Obrázek 5 Mechanismus maternálního imprintingu *IGF2* zapojující ICR i vzdálený enhancer. Otcovský chromozóm: ICR je methylováno → CTCF se neváže → enhancer prostřednictvím vazby na DNA vazebné proteiny v oblasti promotorů spouští expresi *IGF2*. *H19* je umlčen. Mateřský chromozóm: ICR není methylováno → vazba CTCF do ICR → sterické omezení účinnosti enhanceru na bližší vzdálenost → umlčení *IGF2* a exprese *H19*. Vytvořeno podle (31).

Poblíž genu *IGF2* se nachází netranslatované tumor supresorové geny *H19* a *p57kip2*, které jsou také imprintovány. Zde však dochází k opačnému efektu, tedy že mateřská alela je exprimována a umlčena je alela otcovská (tzv. paternální imprinting) (31, 34). Jak již bylo zmíněno výše, imprinting *IGF2* souvisí s imprintingem *H19*. Na tzv. ICR sekvenci mezi nimi, bohatou na GC páry a na otcovském chromozómu hojně methylovanou, nasedá regulační protein CTCF, který reguluje expresi z mateřské alely genu. Když je přítomen CTCF exprimuje mateřská alela gen *H19*. Pokud nenasedne na chromozóm (otcovská alela), přepíše se gen *IGF2*. CTCF blokuje vzdálené působení enhancerů umístěných downstream od *H19* na mateřské alele genu pomocí vzniku intrachromatinové smyčky, což způsobí, že enhancer nezapočne expresi vzdáleného genu *IGF2* (protože jeho promotory jsou stericky bráněné), ale exprimuje bližší gen *H19* (viz Obrázek 5) (31, 42, 43, 46, 60). Zároveň v choroidním plexu, mozkových plenách a játrech, které exprimují obě alely *IGF2*, není *H19* přítomen (39).

Jakým způsobem by mohl imprinting, způsobený methylocemi v ICR, v oblastech promotorů a regulací pomocí CTCF a vzdálených enhancerů, souviset s rozdílnou expresí v imprintovaných versus neimprintovaných tkáních a orgánech a proč v těchto orgánech (a nikde jinde) prokazatelně převládá exprese *IGF2* z promotoru P1, nastínily ve svých publikacích některé skupiny, které zjistili, že CTCF vytváří s DNA-vazebnými proteiny vázanými v oblasti *IGF2* promotorů intrachromatinové smyčky. Pokud CTCF není přítomen, chromatinová smyčka se uzavře tak, že přiblíží enhancer a *IGF2* gen, a tím je zahájena jeho exprese. V přítomnosti CTCF smyčka zahrnuje *IGF2* do hustě sbalené oblasti a ten je pak příliš stericky bráněný a enhancer k němu nepronikne. Proto enhancer místo toho účinkuje na přístupnější gen *H19* (59, 61, 62).

Maternální imprinting genu *IGF2* má velice složitý mechanismus, ale zjednodušeně můžeme shrnout, že na mateřském chromozómu je oblast regulující imprinting (ICR) methylována, což umožní vazbu CTCF, který potom funguje jako sterická zábrana aktivace genové exprese přes vzdálené enhancery. Otcovský chromozóm má ICR methylováno a tudíž na něj nemůže nasednout CTCF a gen *IGF2* může být exprimován.

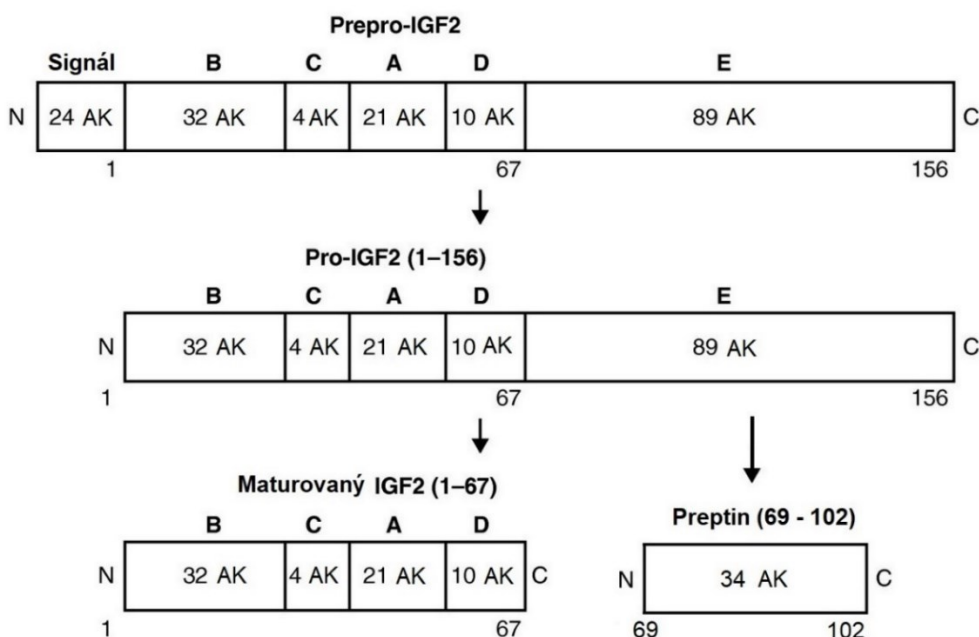
3.2 Pre-pro-IGF2

Po sestřižení výsledné transkribované mRNA vznikají nekódující RNA sekvence různých délek (z exonů 1 až 6) a zbylé exony 7, 8 a 9 dají vznik mRNA, která je dále translatována. Genovou expresí vzniká v lidském těle nejprve 180 aminokyselinový protein prepro-IGF2 (20 kDa), který obsahuje signální sekvenci 24 aminokyselin na N' konci následovanou proteinem pro-IGF2 (156 aminokyselin) (Obrázek 6). Signální sekvence nasměřuje protein do nitra ER, kde je odštěpena proteázami. Po odštěpení signální sekvence a sbalení se do terciární struktury dochází v Golgiho aparátu k O-glykosylaci E domény, která řídí následný vznik IGF2 (63, 64). O-glykosylací je na pozice Ser71, Thr72, Thr75, a Thr139 (v E-doméně) přidán N-acetyl galaktosamin a tím vzniká finální prohormon, který putuje Golgiho aparátem k dalšímu zpracování. V Golgiho aparátu je na sacharidové zbytky přidána kyselina sialová a dochází k endoproteolýze prohormon konvertázami za Arg (konkrétně za Arg 104, 87 a 67). Díky tomu vzniká finální hormon IGF2 a také odštěpky E-domény, mezi nimiž je peptid preptin (64–66).

3.3 Pro-IGF2

Po odštěpení signální sekvence z pre-pro-IGF2 zůstanou domény B-C-A-D-E, které se souhrnně nazývají pro-IGF2. Pro-IGF2 odpovídá sekvenci 1–156 pre-prohormonu (Obrázek 6). Obsahuje 156 aminokyselin a 3 disulfidické můstky. *In vivo* vznikají dvě různé konformace,

kteří se liší uspořádáním disulfidických můstků. Po odštěpení signálního peptidu dochází nejspíše v endoplazmatickém retikulu k reorganizaci disulfidických můstků pravděpodobně za pomoci disulfid izomerázy na pouze jednu variantu konformace (64).



Obrázek 6 Postupné zpracování pre-pro-IGF2 až na finální biologicky aktivní produkt – IGF2 (1–67) a následný sestřih E-domény a vznik druhého biologicky aktivního peptidu, preptinu. Písmena psaná tučně označují domény. AK, aminokyselina; N, N'-konec; C, C'-konec. Upraveno z (67).

Pro-IGF2 neobsahuje žádná místa vhodná pro N-glykosylaci, za to se zde vyskytuje osm serinů a threoninů, které by mohly podléhat O-glykosylaci. Následný experiment prokázal, že glykosylované jsou pouze Ser71, Thr72, Thr75 a Thr139, z nichž nejdůležitější je glykosylace na pozici Thr75 (64). Na ně je nejprve napojen N-acetylgalaktosamin (GalNAc) v *cis*-Golgi (což odpovídá běžnému postupu (68)), následuje přenos (nebo postupné zrání cisterny) přes mediální Golgi do *trans*-Golgi, kdy jsou přidány zbylé sacharidy a nakonec kyselina sialová. Po dokončení kompletní glykosylace zůstává protein v „*trans*-Golgi network“. Celá glykosylace trvá asi 40 min (64). V případě, že je E-doména glykosylována chybně, dochází k nesprávnému štěpení a zrání prohormonu a nezprocessované a dlouhé formy IGF2 nemusejí mít správnou vazbu na vazebné proteiny a receptory (63, 65).

Zatím není zcela jasné, jak probíhá sestřih pro-IGF2. Víme, že díky glykosylaci E-domény je dále processován tak, že se odštěpí E-doména (89 C'-koncových aminokyselin). Víme, že v placentě katalyzuje štěpení prohormonu konvertáza 4 (PC4) v „*trans*-Golgi network“, která přeměňuje na neúplně zpracované IGF2, které se někdy nazývají také jako big-IGF2 (v tomto

případě bigIGF2 (1–104)) na zralý IGF2 (1–67). Tato proteáza se však nevyskytuje mimo pohlavní ústrojí (69). Kromě štěpení před Arg68 podléhá endoproteolýze Arg104 účinkem některé proprotein konvertázy podobné subtilisinu (tzv. SPC podle *angl.* subtilisin-related proprotein convertase, např. furin nebo PC6). Tím vzniká big-IGF2 (1–104) (64, 69).

Processingem pro-IGF2 vzniknou dva biologicky aktivní peptidy: IGF2 a preptin (65, 70). V případě, že E-doména není řádně odštěpena (například kvůli nesprávné glykosylaci či dysfunkcí prohormon konvertázy) vznikají z pro-IGF2 tzv. velké IGF2 (big-IGF2), které jsou sekretovány do krevního oběhu stejně, jako je tomu u IGF2. Ve zdravém organismu odpovídá zastoupení big-IGF2 10–20 % z celkového podílu všech forem IGF2. Dvěma nejdůležitějšími (nejčastějšími) big-IGF2 jsou big-IGF2(1–87) a big-IGF2(1–104) (71, 72). Zvýšený výskyt big-IGF2 byl zaznamenán u rakovinných tkání (65, 73).

3.4 Fyziologické účinky

IGF2 cirkuluje krevním řečištěm. Primárním zdrojem IGF2 jsou játra, ale vzniká téměř ve všech orgánech. Samovolně vydrží v krvi 1–2 min, než se rozpadnou, ale zároveň často působí na velké vzdálenosti od místa vzniku. Poločas života IGF2 v krevním řečišti je způsobená tvorbou binárního (poločas rozpadu 20–30 min) nebo ternárního komplexu (poločas života vzroste až na 12 h) vazbou na ALS a IGF vazebné proteiny (IGFBP) (74–76). Blíže se tématu věnuji v kapitole 4. V těle dospělého člověka cirkuluje až 700 ng / ml IGF2, což je třikrát více než je v těle IGF1 (16).

IGF2 je primárně prenatálním růstovým faktorem, který reguluje správný růst embrya. Jedinci s mutovaným IGF2 dorůstají jen asi 60 % obvyklé velikosti. U vyvíjejícího se plodu odpovídá za správný růst nejen kosterní a svalové tkáně. Po narození jeho zastoupení v téměř všech tkáních prudce klesá a vysoká hladina exprese přetrvává po narození v choroidním plexu a v dospělosti pouze v játrech, kde je využíván specifický promotor (49, 51, 77, 78).

U dospělého člověka je produkován ve všech tkáních těla, ale především v játrech. Játra produkují IGF2 ve vysokých koncentracích a jsou hlavním zdrojem pro dospělého jedince. Dalším orgánem, který je v produkci IGF2 aktivní, je mozek (konkrétně část choroidní plexus a k němu přiléhající mozkové obaly), ale nedosahuje tak velké úrovně exprese jako játra (32, 77, 78). IGF2 umí procházet i přes hematoencefalickou bariéru (79). U dospělých potkanů se prokazatelně zlepšuje paměť a zabraňuje zapomínání, pokud odstraníme inhibitor exprese IGF2 nebo dodáme již hotový IGF2 do příslušné části mozku v průběhu tvorby paměťové stopy. Vazbou na IGF2R v hypokampu prodlužuje životnost synaptického signálu (80). Přesné fungování IGF2 v mozku je stále předmětem mnoha studií.

IGF2 je tedy velice důležitým růstovým faktorem. Jako takový, pokud nastane defekt v jeho produkci, může způsobit mnohá onemocnění. Častější jsou onemocnění spojená s nadprodukcí IGF2. Jedinci s nižší hladinou IGF2 nedosahují běžných velikostí, ale jsou plodní a životaschopní stejně jako zdravé kontroly (51). Zvýšená exprese IGF2 způsobuje nefunkčnost pankreatických β -buněk a zvyšuje pravděpodobnost různých druhů jejich poškození. Molekulárními příčinami těchto projevů je dediferenciace buněk a stres endoplazmatického retikula. Kvůli tomu je buňka více náchylná k poškození a útoku ze strany imunitního systému, což může vést až k odbourávání tkáně vlastním tělem. To se děje například u jedinců s onemocněním diabetes mellitus 2. typu (81). Vyšší množství IGF2 v těle či jeho částech může vést k řadě dalších onemocnění jako NICTH, nádory epitheliální a mezenchymální tkáně apod. (34, 67).

Ztráta imprintingu (a tedy exprese *IGF2* z obou alel) je velice častá v IGF2 dependentních nádorových tkáních a u dalších onemocnění jako je např. Beckwith-Wiedemannův syndrom a Wilmsův nádor, která vznikají v důsledku nadměrného dělení ledvinových buněčných prekursorů (54). Jedním z možných mechanismů ztráty imprintingu je exprese z promotoru P1. V játrech dochází k přirozené expresi tohoto genu z alel od obou rodičů (39). Nádorové tkáně produkují větší množství IGF2, který podporuje jejich růst (potenciálně mechanismem pozitivní zpětné vazby). Zároveň, jak již bylo zmíněno výše, v těchto tkáních chybí imprinting *IGF2*, což může být důvodem k vyšší produkci IGF2 (54).

Díky vysoké homologii s inzulinem se IGF2 a do jisté míry i IGF1 váže na inzulinový receptor a inzulin se váže na IGF receptor. Každý receptor má však jinou afinitu pro tyto ligandy a také jinou fyziologickou funkci.

3.4.1 Vazba na IGF2R

IGF2R se nachází ve všech buněk lidského těla. Na rozdíl od IGF1R a IR, IGF2R váže pouze IGF2 a neváže ani inzulin, ani IGF1. Nejvíce rozšířený je v mozku, játrech a slinivce (pankreatu). Hlavní funkcí vazby IGF2 na IGF2R je endocytóza IGF2 i s jeho receptorem (tzv. internalizace). IGF2 poté putuje do Golgiho aparátu a následně je rozložen v lysozómu a receptor je recyklován zpět na buněčný povrch. Vychytávání IGF2 z krevního řečiště tedy ovlivňuje jeho biodostupnost. Z celkového množství IGF2R je asi 95 % lokalizováno uvnitř buňky a pouze 5 % se vyskytuje na jejich povrchu (26, 34, 82–84).

IGF2R je také receptor pro manózu-6-fosfát (M6P). Má dvě odlišná vazebná místa: jedno pro M6P a druhé pro IGF2 (34, 85). I když IGF2R nemá tyrosinkinázovou doménu uvnitř buňky, zdá se, že ovlivňuje signalizační dráhu zahrnující sfingozinovou a kináze-závislou

transaktivaci „*G-protein coupled sphingosine-1-phosphate*“ receptoru, která spouští mnoho dalších signálních kaskád (86).

3.4.2 Vazba na HI

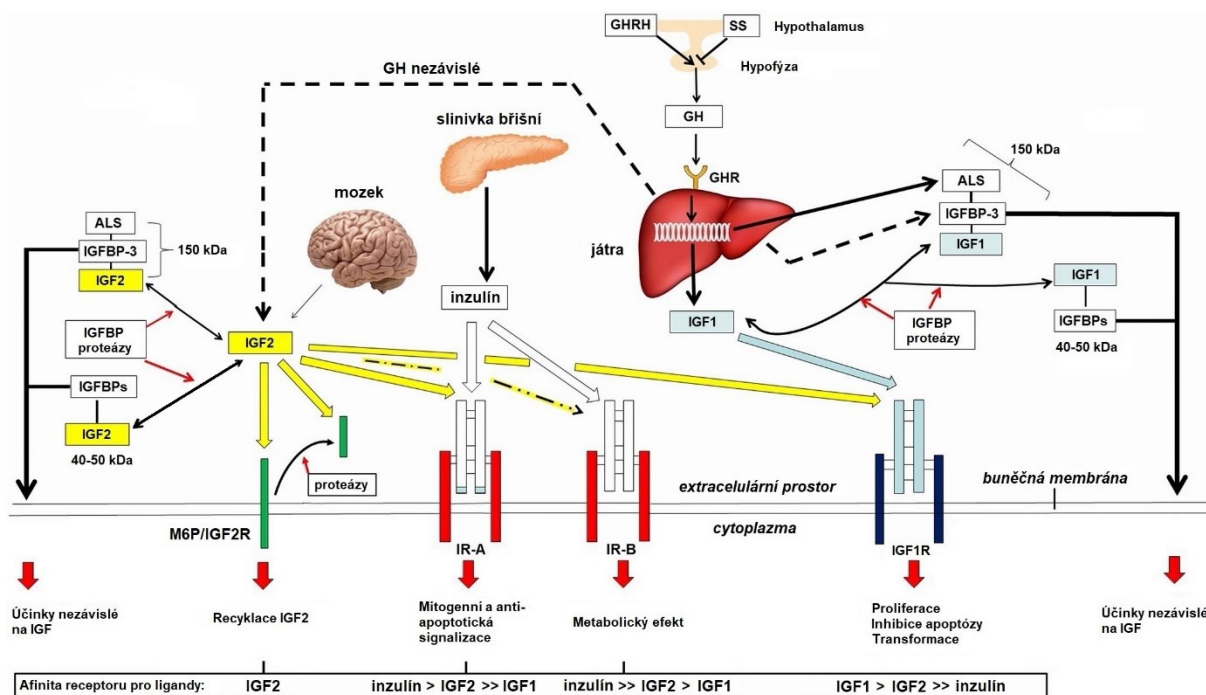
IR je dimerický receptor s tyrozin-kinázovou aktivitou. Důsledkem alternativního sestřihu exonu 11, se vytváří dvě izoformy inzulínových receptorů: IR-A (inzulínový receptor izoforma A) a IR-B (inzulínový receptor izoforma B). Obě izoformy se vzájemně liší pouze přítomností (IR-B) 12 aminokyselin v α -CT-doméně extracelulární části receptoru. Zbytek receptoru a intracelulární tyrozinkinázová doména zůstává u obou forem shodná (70, 87).

IR-A najdeme především v embryonálních tkáních a má vysokou afinitu k inzulínu podobně jako k IGF2 (87). IGF2 se váže na IR-A s téměř stejnou afinitou jako na IGF1R. Vazba IGF2 na IR-A má však jiný účinek než vazba inzulínu: tato vazba vyvolá signalizaci vedoucí k buněčnému dělení, zatímco vazba inzulínu má metabolické účinky (snížení hladiny glukózy). Receptor se po vazbě IGF2 fosforyluje a tím umožní vazbu dokujících proteinů, které dále signalizují kaskádou sekvenčních homologů kolagenu (Shc) následovanými ERK/MAPK dráhou. Nádorové tkáně exprimují nepřiměřeně velké množství IR-A (34, 87).

Naproti tomu IR-B váže s vysokou afinitou pouze inzulín a k IGF2 má velice nízkou vazebnost. Zprostředkovává metabolický efekt tj. snížení hladiny krevní glukózy nebo syntézu glykogenu. Najdeme ho především v metabolicky aktivních tkáních jako jsou játra, svaly nebo tuková tkáň. Vazba IGF2 na IR-B je sice mnohonásobně nižší než inzulínu, ale IGF2 cirkuluje v těle v mnohem vyšších koncentracích než inzulín. Kvůli tomu se může stát, že u pacientů se zvýšenou expresí IGF2 (např. v nádorových tkáních a dalších onemocnění) může IGF2 vazbou na IR vyvolat hypoglykémii (34, 88, 89).

3.4.3 Vazba na IGF1R

Vazba na IGF1R je důležitou interakcí IGF2 s některým z receptorů, neboť zprostředkovává účinek IGF2 uvnitř buňky. IGF1R má afinitu k IGF2 nižší než k IGF1, ale stále se pohybuje v nanomolárních koncentracích; k inzulínu má naopak afinitu velmi nízkou. IGF1R je transmembránový receptor s extracelulární a intracelulární doménou, která má tyrozinkinázovou aktivitu stejně jako IR. Vazba IGF2 na IGF1R vyvolá autofosforylaci tyrozinkinázové domény a následnou signalizační kaskádu (adaptorové proteiny \rightarrow fosfatidylinositol-3-kináza \rightarrow protein kináza B \rightarrow MAPK dráha), která nakonec způsobí proliferaci buněk, inhibuje apoptózu a zvýší prezentaci glukózového transportéru na povrchu buněk svalové a tukové tkáně (12, 26, 67).



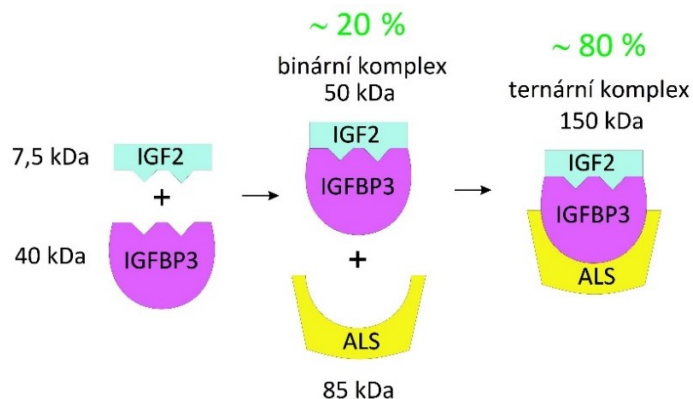
Obrázek 7 Přehled fyziologických funkcí IGF2 (žlutě), jeho vazby na receptory IGF1R, IGF2R a IR a porovnání s činností inzulinu (bílý) a IGF1 (světle modrý). IGF2 má velký význam při embryonálním vývoji. Váže se na všechny receptory z rodiny inzulinu, avšak s různými účinnostmi. Nejstabilnější je vazba na IGF2 receptor (IGF2R), středně silná vazba na inzulinový receptor izoformy A i B (IR-A, IR-B) a nejslabší na IGF1-receptor (IGF1R). IGF1R a částečně také IR-A zprostředkovávají signály IGF2 do buňky, které vedou především k proliferaci a inhibici apoptózy. GHRH, hormon regulující produkci GH; SS, somatostatin; GH, růstový hormon; GHR, receptor růstového hormonu. Přeloženo z (70).

4 IGF2BP

IGF2 je z jater, slinivky břišní a dalších orgánů sekretován do krve, kde je velice rychle degradován. Aby se zabránilo předčasné degradaci IGF2 před jeho doručením na místo určení, váže se v krvi na vazebné proteiny (IGFBP, z *angl.* IGF binding proteins). S těmi poté putuje krví až k určené tkáni, kde se odváže a nasedne na buněčné receptory. Vazebné proteiny zůstávají v krvi a recyklují se na další použití. Proteiny s podobnou funkcí jako mají lidské IGFBP nalézáme také u bezobratlých živočichů (např. u octomilky zastává obdobnou funkci protein Imp-L2) i dalších obratlovců, což dokazuje jejich evoluční konzervovanost (23, 70, 90).

IGFBP má 2 domény (N-terminální a C-terminální) spojené lineární střední částí, které jsou schopny vázat IGF a také ALS (91). IGF po sekreci do krve vytváří nejčastěji stabilní ternární komplex vazbou na IGFBP a zároveň na glykosylovaný protein ALS (z *angl.* acid labile subunit), který vydrží v krvi 12–16 h (Obrázek 8). Vznik ternárního komplexu inhibuje účinky IGF2, ale prodlužuje jeho životnost v krevním řečišti (až na 12–16 hodin), takže je dopraven i k více vzdáleným částem těla (34, 74–76). Po dopravení na místo určení je IGF2 proteolyticky

štěpen z binárního nebo ternárního komplexu a nasedá na příslušný receptor, který zprostředkuje jeho účinky dále do buňky (70, 92).



Obrázek 8 Schematické znázornění tvorby binárního a ternárního komplexu vazbou IGF2 na, v krvi nejvíce zastoupený, IGFBP3 a následné vazby s ALS. Binární komplex je zastoupen pouze 20 %, zatímco zbylých 80 % formuje do ternárního komplexu. Vytvořeno podle (34).

Prozatím bylo nalezeno 6 IGFBP (IGFBP-1–6), které váží IGF1 a IGF2 s různými afinitami. IGFBP-1 a -2 jsou v krvi ženy přítomny v největší koncentraci v průběhu těhotenství (92). Zvýšená koncentrace IGFBP-2 a -6 je charakteristická pro pacienty s NICTH a koncentrace IGFBP-6 v krvi je závislá na věku a pohlaví (93, 94). Nejvíce zastoupeným v krevní plazmě je IGFBP-3 (95 % všech IGFBP), který váže největší množství IGF2, a následuje ho IGFBP-5, který v některých tkáních přebírá jeho funkci (34, 95). Pro IGFBP-4 zatím neznáme přesná fyziologická využití, ale víme, že v krvi není zastoupen tolik jako v tkáních a tedy by mohl hrát největší roli v lokální dostupnosti, příp. vyvazovat IGF2 z vazby na receptor (85).

Kromě těchto 6 IGFBP existuje ještě 6 proteinů z rodiny CCN (z *angl.* connective tissue growth factor cysteine rich protein), které jsou velké 30–40 kDa a mají jednu z domén, která je velice podobná IGFBP. Jejich afinita k IGF je ale velice nízká (100 krát až 1000 krát nižší než mají IGFBP), a proto je nezahrnujeme mezi IGFBP (34, 70, 95).

IGFBP nejsou pouhými „obalovači“ IGF, jak by se na první pohled mohlo zdát. Díky komplexním možnostem tvorby binárního nebo ternárního komplexu hrají důležitou úlohu v regulaci dostupnosti IGF. Inhibují např. vazbu na IGF1R, protože mají vyšší afinitu k IGF než tento receptor (91, 93, 96).

Velké IGF2 („big-IGF2“) se také váží na IGFBP (65). Preferenčně dávají vzniknout binárnímu komplexu (IGFBP + big-IGF2) než stabilnějšímu ternárnímu komplexu. Výrazně se však liší schopnost velkých IGF2 a IGF2 tvořit ternární komplex: IGFBP-3 má v přítomnosti pro-IGF2 sníženou schopnost vytvářet ternární komplex, zatímco IGFBP-5 vytváří po vazbě pro-

IGF2 ternární komplex stejně snadno, jako s maturovaným IGF2 (75). Za fyziologických podmínek přítomnost IGF2 inhibuje vazbu big-IGF2 na vazebné proteiny, což se jeví jako potenciální lék / prevence rakovinného bujení, NICTH, osteosklerózy asociované s hepatitidou C a dalších onemocnění (73).

5 Preptin

V roce 2001 byl v sekrečních granulích pankreatických β -buněk (linie β TC6-F7) objeven krátký peptid, který svou sekvencí odpovídá E doméně pro-IGF2. Dlouho byl přehlížen jako důsledek nedokonalé izolace IGF2, avšak nakonec bylo prokázáno, že v těle vzniká cíleně a mohl by mít biologické účinky. Buchanan et al. tento peptid pojmenovali preptin (66).

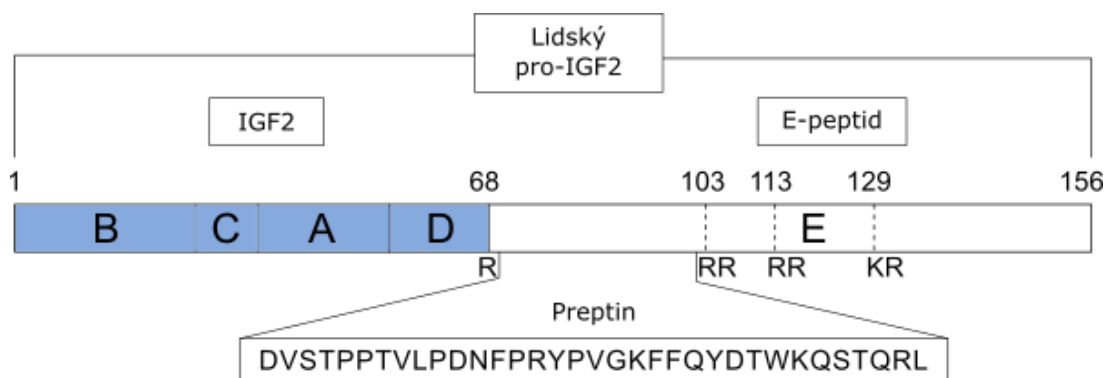
Preptin vzniká v β -buňkách pankreatu, ale také v dalších tkáních těla, například ve slinných a prsních žlázách a ledvinách (66, 97, 98). Protože se jedná o odštěpek E-domény pro-IGF2, měl by vznikat všude tam, kde se exprimuje tento prohormon (viz předešlé kapitoly). Po svém vzniku se vylévá přímo do krve, kde se jeho poločas rozpadu dramaticky snižuje na méně než 5 min a po 15 min již není v plazmě detekovatelný (99).



Obrázek 9 Porovnání primární struktury lidského, myšího a potkaního preptinu a jejich molekulové hmotnosti. Vytvořeno podle (97).

5.1 Struktura a vznik

Preptin je 34 aminokyselin dlouhý peptid s molekulovou hmotností 3948 Da u myši a 4031 Da u člověka. Jeho primární struktura je evolučně relativně konzervována, jak dokazuje porovnání sekvencí lidského, myšího a potkaního preptinu (Obrázek 9). Lidský preptin se shoduje s myším na 79,4 % a s potkaním má 75,5 % podobnost. Myší a potkaní preptin jsou navzájem homologní z 94,1 % (66, 97). Aminokyselinová sekvence odpovídá E-doméně pro-IGF2 (konkrétně části Asp69–Leu102 pro-IGF2), ze kterého preptin vzniká štěpením za R68 (Obrázek 10) (66).



Obrázek 10 Struktura lidského preptinu v kontextu celého pro-IGF2. Modře vyznačeny domény IGF2, bílá E-doména s naznačenými proteolytickými místy v okolí Arg (R). Čísla značí pořadí aminokyseliny v propeptidu. Převzato a upraveno podle (66).

Sekundární struktura preptinu zatím nebyla určena, ale první studie z cirkulárního dichroismu (100) a nukleární magnetické resonance ukazují, že se bude jednat o neuspořádanou strukturu. Tomu, že preptin pravděpodobně nemá žádnou pevnou sekundární strukturu, odpovídá i absence disulfidického můstku. Absenci sekundární struktury může zapříčiňovat také přítomnost mnoha prolinů, které narušují strukturu šroubovice a tvorbu globulárního proteinu (101). Nepřítomnost sekundární struktury se dokázala pomocí CD (102) i u N-koncového fragmentu preptinu, kde se ale objevilo maximum v 220 nm typické pro polyprolinové řetězce (preptin 1–16).

5.2 Fyziologické účinky

Původní objev zjistil, že preptin je sekretován z pankreatických β -buněk (u linií β TC6-F7 i běžných potkaních Langerhansových ostrůvků) spolu s inzulinem po jejich stimulaci glukózou. Myši preptin zvyšuje u těchto buněk druhou fázi sekrece inzulinu (koncentrace glukózy je v této fázi sekrece větší než 20 mM), ale nemá vliv v přítomnosti pouze bazální hladiny glukózy (5,5 mM). Tyto výsledky byly potvrzeny pomocí RIA pokusů *ex vivo* na slinivce i *in vitro* na β TC6-F7 i na MIN6 buňkách. Množství sekrece inzulinu je závislé na koncentraci stimulujícího preptinu (66, 103). Pokud byly β TC6-F7 buňky stimulovány lidským preptinem, nedošlo k žádnému výlevu inzulinu, za to potkaní preptin sekreci umožnil i v mikromolárních koncentracích bez ohledu na koncentraci glukózy (100). V krvi člověka se preptin vyskytuje ve fyziologických koncentracích 8–10 ng / ml (97).

Vyšší hladinu preptinu v krvi zaznamenali u pacientů s onemocněním diabetes mellitus 2. typu a to s rozdílným navýšením podle pohlaví pacientů (104). Ženy s onemocněním gestační

diabetes mellitus (tzv. těhotenská cukrovka) mají zvýšenou hladinu preptinu v krvi matky, pupečnickové krvi i v mateřském mléce. Množství sérového preptinu se u matky s GDM zvyšuje až po porodu (na hodnotu cca 2 ng / ml), během těhotenství zůstává stejné jako u zdravých jedinců (kolem 1 ng / ml). Může to souviset také s kolísající hladinou inzulínu, kterého je u těchto pacientek během těhotenství i po porodu v krvi méně v porovnání se zdravými kontrolami (98, 105, 106). Zvýšenou hladinu preptinu v krvi zaznamenali lékaři také u pacientů a pacientek s polycystickým ovariálním syndromem (PCOS), s nemocemi ovlivňujícími pružnost endotelu koronárních tepen (např. aterosklerózou, značení také CAC a CAD z *angl.* coronary artery calcification a coronary artery disease) a s hypertenzí (107–110).

Preptin by také mohl mít vliv na osteogenezi. V roce 2007 vyšel článek, který potvrzuje, že preptin podporuje proliferaci a diferenciaci osteoblastů a brání jejich apoptóze, ale nejspíš nemá vliv na činnost osteoklastů (111). Výzkum byl prováděn s lidským a potkaním preptinem v koncentracích vyšších než 10^{-11} M (obvykle účinkoval neefektivněji v koncentracích 10^{-9} M) na primárních potkaních prekurzorech osteoblastů, myších MC3T3-E1 buňkách a lidských SaOS-2 buňkách. Jakým způsobem preptin proliferaci kostní tkáně stimuluje zatím není zcela jasné. Pravděpodobně se jedná o regulaci prostřednictvím p42/p44 MAPK (také zvané ERK, na zbylých MAPK – p38 a JNK – nebyla pozorována signifikantní změna) napojené na CTGF nebo Wnt/ β -kateninovou dráhu, která následně zvyšuje množství markerů růstu osteoblastů RUNX-2, OCN a ALP-1. Preptin nejspíš účinkuje přes receptor asociovaný s G-proteinem, protože toxin z bakterie *Bordetella pertussis* neutralizuje efekt preptinu. Konkrétní receptor preptinové interakce, ale zatím nebyl nalezen (111–113). Jak dokazuje studie (114) u člověka je hladina preptinu v krvi snížena u mužů s osteoporózou a s osteopenií oproti kontrolním jedincům a i další data ukazují, že by preptin mohl hrát významnou roli při formaci kostní tkáně (114).

5.3 Analogy preptinu

Analogy preptinu se připravují kvůli zvýšení jeho stability v krevním řečišti, zlepšení preptinem stimulované sekrece inzulínu či jinému vylepšení jeho účinků na živé organismy. Díky tomu, by se analogy preptinu mohly využívat ve farmakologickém průmyslu jako léky na např. osteoporózu či diabetes mellitus.

Prvním připraveným analogem preptinu byl N-koncový 16 aminokyselinový fragment odpovídající sekvenci 68–84 pro-IGF2. Bylo prokázáno, že tento peptid nemá vliv na sekreci inzulínu (66) ani na sacharidový metabolismus (115). Tento fragment ale zvětšuje kostní hmotu a mineralizaci kostní tkáně u myší (116). Protože má vliv na růst kostní tkáně, ale neovlivňuje metabolismus sacharidů, mohl by tento analog mít potenciál jako budoucí léčivo u onemocnění

souvisejících s řídnutím kostní hmoty. Jeho délka (16 aminokyselin) by mohla být dobře využitelná i při komerční přípravě více než přirozeně dlouhý preptin (34 aminokyselin) (102).

5.3.1 Záměna aminokyselin

Preptin je v těle štěpen endogenními proteázami za Phe21. Jeho poločas rozpadu je cca 5 min. Z tohoto důvodu si některé práce vybraly náhradu tohoto Phe21, aby zvýšili dobu života preptinu v živých organismech (99).

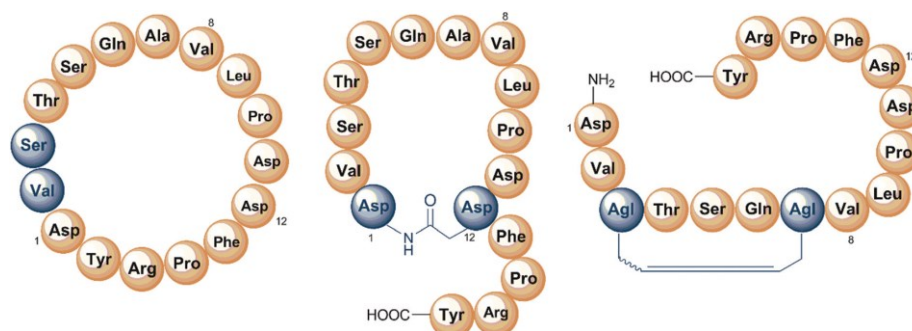
Záměnou Phe21 za neproteinogenní D-Phe, D-Hphe, 3-aminobenzoovou kyselinu a nakonec za 1-aminocyklooktan-1-karboxylovou kyselinu byly připraveny analogy preptinu, které nezvyšovaly sekreci inzulínu pankreatických β -buněk. Tyto aminokyseliny byly vybrány hlavně z důvodu předpokládané tvorby sekundární struktury a nelyzovatelnosti D-aminokyselin endoproteázami. Sekundární strukturu peptid nezažal nahrazením žádnou z uvedených aminokyselin (CD detekce sekundární struktury v různých pufrách). Zvýšila se však jeho odolnost vůči proteázám. V chymotrypsinu vydržel neupravený preptin 2 min, kdežto všechny připravené analogy vydržely až 10 min. U analogů s D-Phe a D-Hphe byla zaznamenána až dvakrát zvýšená sekrece inzulínu oproti sekreci vyvolané lidským preptinem při přítomnosti i v nepřítomnosti glukózy. Sekrece inzulínu analogy zůstala velice podobná sekreci vyvolané nemodifikovaným potkaním preptinem (100).

V souladu s předpokladem, že N-koncový fragment preptinu (1–16) má větší potenciál než celý preptin, Amso a spol. (102) vytvořili analogy preptinu (1–16) nejprve postupnou záměnou všech aminokyselin za alanin (vyjma Ala v pozici 7, který byl nahrazen Gly), aby stanovili, která část preptinového fragmentu je zodpovědná za jeho biologickou aktivitu. V jejich zjištění vyplývá, že biologicky důležité jsou aminokyseliny v pozici 3 (Ser) a v pozici 14 (Pro), protože oba tyto Ala analogy mírně zvyšovali proliferaci primárních potkaních osteoblastů. Záměna Ser na pozici 3 alaninem účinkovala při nižších koncentracích (10^{-10}) než záměna Pro14. Proto pokračovali nahrazováním Ser3 za neproteinogenní aminokyseliny norleucin, homoleucin, norvalin a 1-amino-1-cyklobutankarboxylovou kyselinu. Takto připravené analogy byly výrazně pomaleji odbourávány jaterními enzymy, nejstabilnější se ukázal analog s 1-amino-1-cyklobutankarboxylovou kyselinou na pozici 3, ale žádný z těchto analogů nevykazoval biologickou aktivitu na primárních osteoblastech (102).

Analogy N-koncového fragmentu se zabývali i další autoři. Užívali modifikace jinými aminokyselinami a také tvorby co nejkratšího peptidu, který by stále měl biologický efekt. Některé

analogy mírně zvyšují preptinem indukovaný růst kostní tkáně, jiné nevykazují žádnou biologickou aktivitu. Nejkratším preptinovým fragmentem, který stimuluje proliferaci a diferenciaci osteoblastů byl stanoven fragment preptin (1–8) (117).

5.3.2 Cyklické preptiny



Obrázek 11 Struktura cyklických analogů fragmentu preptinu (1–16). Převzato z (102).

Jelikož se zdá, že preptin nemá žádnou přesnou sekundární ani vyšší strukturu (100), která by určovala vazbu na biologické receptory, oddalovala endoproteolýzu apod., je snahou vytvořit takový analog preptinu, který by zaujímal vyšší prostorové uspořádání. Proto někteří autoři vytvářejí např. cyklické analogy preptinu a zkoumají jejich vliv na biologické vlastnosti peptidu. (102, 117) připravili tři cyklické fragmenty (1–16) (struktury viz Obrázek 11), detekovali jejich sekundární strukturu pomocí CD a měřili jejich biologické vlastnosti. Ani jeden analog nevytvořil sekundární strukturu, některé dokonce ztratili i specifickou polyprolinovou strukturu. Ani jeden analog také nevykazoval účinek na osteoblasty ve fyziologických koncentracích odpovídajících preptinu (102). Stejným způsobem byly připraveny i další cyklické analogy fragmentu preptinu. Ani zde ale nebyl zaznamenán zvýšený růst kostní hmoty (117).

6 Závěr a diskuze

Jak se označuje gen pro IGF2? Proč to každý uvádí jinak a liší se to u různých živočichů? Gen proteinu IGF2 se pojmenovává dle nového názvosloví u člověka verzálkami a kurzívou, kdežto u myši a potkana je velké pouze první písmeno názvu genu a zbytek je malý. Kurzíva je zachována u všech druhů. U každého druhu se používá (dle nových pravidel) jiné konsensus označení genů. Avšak než byla tato pravidla zavedena, bylo publikováno značné množství článků, které se od tohoto konsensu lišily. Proto každý autor uvádí jiné pojmenování genu inzulínu podobného růstového faktoru 2. Stejně tak se mezi publikacemi liší pojmenování proteinu IGF2 (obzvlášť zda používat řeckou nebo arabskou číslici a zda psát spojovník či nikoliv). Zde jsou platné různé varianty (IGF2, IGF-2, i IGF-II), ale dle nových norem je správnější varianta IGF2. Záleží však na požadavcích daného časopisu, jak si editoři přejí, aby byl protein značen.

Exprese genu *IGF2* není triviální záležitostí. Z důvodu velkého množství exonů (devět exonů z toho finálními kódujícími exony jsou pouze exony 7–9) i promotorů (u člověka 4 + 1) dochází k různým hladinám i úrovním exprese v různých částech těla. Každý promotor je využíván tkáňově i vývojově specificky. Navíc se exprese tohoto genu liší nejen v rámci orgánů, ale také v průběhu života jedince a to také v závislosti na alele původu (maternální imprinting). Samotný mechanismus imprintingu je také velice komplikovaný (zahrnuje regulaci genové exprese pomocí vzdálených enhancerů a jejich inhibici CTCF, proteinem vázaným v místě nemetylovaného ICR). Kromě poměrně složité regulace genové exprese je velice přísně regulovaná také dostupnost IGF2 jednotlivým tkáním. Po translaci do prohormonu podléhá pro-IGF2 několika proteolytickým štěpením, která závisejí na bezchybné glykosylaci v Golgiho aparátu. Dokonce i plně maturovaný IGF2 je regulován vazbou na IGFBP, které omezují jeho dostupnost v jednotlivých orgánech. Tento komplexní systém umožňuje regulovat hladinu pro-IGF2 a z něj odvozených polypeptidů napříč vývojem jedince, což dokazuje, jak důležitým regulačním faktorem IGF2 je, pokud podléhá tolika různým úrovním genové i proteinové regulace.

IGF2, ač mnohem méně prozkoumaný než insulin a IGF1, se poslední dobou zdá mít čím dál větší fyziologický význam. Pro jeho důležitost hovoří vysoká hladina v krevním řečišti v dospělosti (třikrát více než IGF1 desetkrát více než insulin). Zdá se, že je nejen důležitým růstovým faktorem v embryonálním a postnatálním vývoji, ale že v dospělosti hraje velkou roli v centrální nervové soustavě a uchování paměti. Druhým ještě méně prozkoumaným peptidem odvozeným z pro-IGF2 je preptin. Vzhledem k odlišným fyziologickým hladinám preptinu u některých onemocnění bude preptin hrát v těchto onemocněních určitou roli. K objevu preptinu

došlo poměrně nedávno, informace o něm obsahuje pouze několik desítek článků a jeho fyziologický význam je prozatím nejasný. Jeho sekundární struktura zatím nebyla nalezena a některé články uvádějí, že díky velkému podílu prolinů nejspíš ani žádná nebude. Naopak při přípravě analogů, u kterých vznikla vyšší struktura došlo k potlačení preptinové aktivity. Zároveň také nebyl zatím nalezen receptor, na který se preptin váže. Vzhledem k absenci sekundární struktury je i hledání receptoru složitější. Je možné, že se preptin sbalí do příslušné konformace až v těsné blízkosti příslušného receptoru nebo mu v tom pomáhají i některé ionty či molekuly v jeho těsném okolí.

Jak již bylo zmíněno výše, fyziologické funkce preptinu zatím nejsou přesně určeny. Často se však setkáváme v metodách pro radiometrické měření pro-IGF2 (shrnutí v (34)) se specifickými protilátkami proti E-doméně. Většina z těchto protilátek využívá vazebnou afinitu k části E-domény, která je zároveň částí preptinu či dokonce celým preptinem. Proto předpokládáme, že některé z těchto radioimmunologických postupů by mohly detekovat místo celého pro-IGF2 pouze preptin. Pokud by to byla pravda, zvětšilo by se naše poznání o výskytu a zastoupení preptinu v mnoha tkáních těla a to by mohlo pomoci k lepšímu a přesnějšímu stanovení jeho fyziologických funkcí.

Zvýšená hladina preptinu byla zaznamenána u PCOS, GDM ale také u CAC / CAD a má nejspíše spojitost s přestavbou kostní tkáně a osteoporózou (102, 105, 107, 111). Při PCOS dochází k chybné produkci estrogenů a gestagenů (ženských pohlavních hormonů) pohlavními žlázami kvůli jejich malformaci v rakovinovou tkáň. Osteoporóza se projevuje hlavně u žen v období menopauzy, která je typická klesající koncentrací estrogenu. Ateroskleróza koronární artérie se léčí estrogenovou terapií. Proto se domníváme, že tyto projevy nejsou pouze náhodné a že by si možná zasluhoval větší pozornost výzkum, jakým způsobem by tyto ženské pohlavní hormony mohly fungovat s preptinem nejen na úrovni celého organismu a jeho tkání (kde se vzájemné ovlivnění estrogenu / progesteronu a preptinu dá odhadnout z již stanovených výsledků), ale také jak spolu tyto látky spolupracují, komunikují či jinak interagují na úrovni molekulární a buněčné. K tomu je však za potřebí nejprve prozkoumat samotný účinek preptinu na tkáň našeho zájmu. Fakt, který se bohužel neslučuje s hypotézou, že by preptin účinkoval v organismu podle hladiny ženských pohlavních hormonů v těle, zůstává to, že při výzkumu koncentrací preptinu u matek s GDM ověřovali také hladinu progesteronu, která zůstávala shodná nezávisle na koncentracích preptinu u všech pacientek (105). Pro toto by ale mohla být vysvětlením souvislost hladiny preptinu s hladinou inzulínu, který je hlavním faktorem zodpovědným za onemocnění diabetes mellitus. Baykus a spol. (105) polemizují, že odlišné chování preptinu při různých koncentracích inzulínu by mohlo být způsobené také zvýšenou hladinou

glukózy, která může inhibovat preptin. Předpokládáme tedy, že regulace preptinu bude podléhat několika různým faktorům. Díky své potenciální prosperitě v léčbě osteoporózy je proto preptin zajímavým peptidem, který si zasluhuje další zkoumání zejména na molekulární a buněčné úrovni.

7 Seznam zkratek

ALP	alkalická fosfatáza (z <i>angl.</i> alkaline phosphatase)
ALS	podjednotka citlivá na kyselé pH (z <i>angl.</i> acid-labile subunit)
cAMP	cyklický adenosin monofosfát
CAC / CAD	koronární ateroskleróza, také nazývaná ischemická choroba srdeční (z <i>angl.</i> coronary artery calcification / coronary artery disease)
CD	cirkulární dichroismus
CTCF	CCCTC-vazebný faktor (z <i>angl.</i> CCCTC-binding factor)
ERK	z <i>angl.</i> extracellular signal-regulated kinases
GDM	gestační (těhotenský) diabetes mellius
GH	růstový hormon (z <i>angl.</i> growth hormone)
ICR	oblast na chromozómu, které kontroluje imprinting (z <i>angl.</i> imprinting-control region)
IGF	inzulínu podobný růstový faktor (z <i>angl.</i> insulin-like growth factor)
IGFBP	IGF vazebný protein (z <i>angl.</i> IGF binding protein)
IGF2R	z <i>angl.</i> insulin-like growth factor 2 receptor
Imp-L2	imaginální morfogenický protein Late2, analog IGF2 u octomilky (z <i>angl.</i> imaginal morphogenesis protein-Late2)
INSL peptidy	inzulínu podobné peptidy (z <i>angl.</i> insulin like peptides)
IR	insulinový receptor
IR-A	isoforma A insulinového receptoru
IR-B	isoforma B insulinového receptoru
MAPK	mitogenem aktivovaná protein kináza (z <i>angl.</i> mitogen-activated protein kinase)
M6P	manóza-6-fosfát (z <i>angl.</i> mannose-6-phosphate)
NICTH	z <i>angl.</i> non-islet cell tumor hypoglycemia
NMR	nukleární magnetická rezonance
OCN	osteokalcin (z <i>angl.</i> osteocalcin)
PCOS	polycystický ovariální syndrom (z <i>angl.</i> polycystic ovary syndrome)
RUNX-2	transkripční faktor, ovlivňuje růst a množení osteoblastů (z <i>angl.</i> runt-related transcription factor 2)
5' UTR	5' nepřekládaná oblast (z <i>angl.</i> 5' untranslated region)

8 Přehled literatury

Sekundární citace jsou označeny *.

1. Le Roith, D., Shiloach, J., Roth, J. a Lesniak, M. A. Evolutionary origins of vertebrate hormones: Substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6184–6188 (1980).
2. *Blundell, T. L. a Humbel, R. E. Hormone families: Pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature* **287**, 781–787 (1980).
3. Ryle, A. P., Sanger, F., Smith, L. F. a Kitai, R. The disulphide bonds of insulin. *Biochem. J.* **60**, 541–556 (1955).
4. Steiner, D. F., Cunningham, D., Spigelman, L. a Aten, B. Insulin biosynthesis: Evidence for a precursor. *Science* **157**, 697–700 (1967).
5. *Aragón-Herrera, A. A summary about relaxin and its reproductive function. *Endocrinol. Int. J.* **4**, (2017).
6. Sheau, Y. H., Nakabayashi, K., Nishi, S., Kumagai, J., Kudo, M., Sherwood, O. D. a Hsueh, A. J. W. Activation of orphan receptors by the hormone relaxin. *Science* **295**, 671–674 (2002).
7. Schwabe, C., Ken McDonald, J. a Steinetz, B. G. Primary structure of the B-chain of porcine relaxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**, 503–510 (1977).
8. Schwabe, C., Ken McDonald, J. a Steinetz, B. G. Primary structure of the A chain of porcine relaxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **70**, 397–405 (1976).
9. Schwabe, C. a McDonald, J. K. Relaxin: A disulfide homolog of insulin. *Science* **197**, 914–915 (1977).
10. *Teichman, S. L., Unemori, E., Teerlink, J. R., Cotter, G. a Metra, M. Relaxin: Review of biology and potential role in treating heart failure. *Curr. Heart Fail. Rep.* **7**, 75–82 (2010).
11. *Bathgate, R. A. D., Halls, M. L., van der Westhuizen, E. T., Callander, G. E., Kocan, M. a Summers, R. J. Relaxin family peptides and their receptors. *Physiol. Rev.* **93**, 405–480 (2013).
12. *Bergman, D., Halje, M., Nordin, M. a Engström, W. Insulin-like growth factor 2 in development and disease: A mini-review. *Gerontology* **59**, 240–249 (2013).
13. Rinderknecht, E. a Humbel, R. E. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* **253**, 2769–2776

- (1978).
14. Rinderknecht, E. a Humbel, R. E. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.* **89**, 283–286 (1978).
 15. Blundell, T. L., Bedarkar, S., Rinderknecht, E. a Humbel, R. E. Insulin-like growth factor: A model for tertiary structure accounting for immunoreactivity and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **75**, 180–184 (1978).
 16. *Humbel, R. E. Insulin-like growth factors I and II. *Eur. J. Biochem.* **190**, 445–462 (1990).
 17. Bell, G. I., Gerhard, D. S., Fong, N. M., Sanchez-Pescador, R. a Rall, L. B. Isolation of the human insulin-like growth factor genes: Insulin-like growth factor II and insulin genes are contiguous. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6450–6454 (1985).
 18. *Le Roith, D., Bondy, C., Yakar, S., Liu, J.-L. a Butler, A. The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr. Rev.* **22**, 53–74 (2001).
 19. *Le Roith, D. Insulin-like growth factors. *N. Engl. J. Med.* **336**, 633–640 (1997).
 20. Enberg, G., Carlquist, M., Jörnvall, H. a Hall, K. The characterization of somatomedin A, isolated by microcomputer-controlled chromatography, reveals an apparent identity to insulin-like growth factor 1. *Eur. J. Biochem.* **143**, 117–124 (1984).
 21. Pierson, R. W. a Temin, H. M. The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. *J. Cell. Physiol.* **79**, 319–329 (1972).
 22. *Engström, W., Shokrai, A., Otte, K., Granerus, M., Gessbo, A., Bierke, P., Madej, A., Sjolund, M. a Ward, A. Transcriptional regulation and biological significance of the insulin like growth factor II gene. *Cell Prolif.* **31**, 173–189 (1998).
 23. Honegger, B., Galic, M., Köhler, K., Wittwer, F., Brogiolo, W., Hafen, E. a Stocker, H. Imp-L2, a putative homolog of vertebrate IGF-binding protein 7, counteracts insulin signaling in Drosophila and is essential for starvation resistance. *J. Biol.* **7**, 10 (2008).
 24. Cooke, R. M., Harvey, T. S. a Campbell, I. D. Solution structure of human insulin-like growth factor 1: a nuclear magnetic resonance and restrained molecular dynamics study. *Biochemistry* **30**, 5484–5491 (1991).
 25. Torres, A. M., Forbes, B. E., Aplin, S. E., Wallace, J. C., Francise, G. L. a Norton, R. S. Solution structure of human insulin-like growthfactor II. Relationship to receptor and binding protein interactions. *J. Mol. Biol.* **248**, 385–401 (1995).
 26. Alvino, C. L., Ong, S. C., McNeil, K. A., Delaine, C., Booker, G. W., Wallace, J. C. a Forbes, B. E. Understanding the Mechanism of Insulin and Insulin-Like Growth Factor

- (IGF) Receptor Activation by IGF-II. *PLoS One* **6**, e27488 (2011).
27. Bateman, A. *et al.* UniProt: The universal protein knowledgebase in 2021. *Nucleic Acids Res.* **49**, D480–D489 (2021).
 28. Brissenden, J. E., Ullrich, A. a Francke, U. Human chromosomal mapping of genes for insulin-like growth factors I and II and epidermal growth factor. *Nature* **310**, 781–784 (1984).
 29. Tricoli, J. V., Rall, L. B., Scott, J., Bell, G. I. a Shows, T. B. Localization of insulin-like growth factor genes to human chromosomes 11 and 12. *Nature* **310**, 784–786 (1984).
 30. Harper, M. E., Ullrich, A. a Saunders, G. F. Localization of the human insulin gene to the distal end of the short arm of chromosome 11 (gene mapping/in situ hybridization/recombinant DNA). *Genetics* **78**, 4458–4460 (1981).
 31. *Reik, W. a Murrell, A. Silence across the border. *Nature* **405**, 408–409 (2000).
 32. Vu, T. H. a Hoffman, A. R. Promoter-specific imprinting of the human insulin-like growth factor-II gene. *Nature* **371**, 714–717 (1994).
 33. van Dijk, M. A., van Schaik, F. M. A., Bootsma, H. J., Holthuisen, P. a Sussenbach, J. S. Initial characterization of the four promoters of the human insulin-like growth factor II gene. *Mol. Cell. Endocrinol.* **81**, 81–94 (1991).
 34. *Dynkevich, Y., Rother, K. I., Whitford, I., Qureshi, S., Galiveeti, S., Szulc, A. L., Danoff, A., Breen, T. L., Kaviani, N., Shanik, M. H., LeRoith, D., Vigneri, R., Koch, C. A. a Roth, J. Tumors, IGF-2, and Hypoglycemia: Insights From the Clinic, the Laboratory, and the Historical Archive. *Endocr. Rev.* **34**, 798–826 (2013).
 35. *Holly, J. F., Biernacka, K. a Perks, C. M. The neglected insulin: IGF-II, a metabolic regulator with implications for diabetes, obesity, and cancer. *Cells* **8**, 1207 (2019).
 36. *O'Dell, S. D. a Day, I. N. M. Insulin-like growth factor II (IGF-II). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 767–771 (1998).
 37. Monk, D., Sanches, R., Arnaud, P., Apostolidou, S., Hills, F. A., Abu-Amero, S., Murrell, A., Friess, H., Reik, W., Stanier, P., Constância, M. a Moore, G. E. Imprinting of IGF2 P0 transcript and novel alternatively spliced INS-IGF2 isoforms show differences between mouse and human. *Hum. Mol. Genet.* **15**, 1259–1269 (2006).
 38. de Pagter-Holthuisen, P., Jansen, M., van der Kammen, R. A., van Schaik, F. M. A. a Sussenbach, J. S. Differential expression of the human insulin-like growth factor II gene. Characterization of the IGF-II mRNAs and an mRNA encoding a putative IGF-II-associated protein. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **950**, 282–295 (1988).
 39. Ohlsson, R., Hedborg, F., Holmgren, L., Walsh, C. a Ekström, T. J. Overlapping patterns

- of IGF2 and H19 expression during human development: Biallelic IGF2 expression correlates with a lack of H19 expression. *Development* **120**, 361–368 (1994).
40. de Pagter-Holthuizen, P., Jansen, M., van Schaik, F. M. A., van der Kammen, R., Oosterwijk, C., Van den Brande, J. L. a Sussenbach, J. S. The human insulin-like growth factor II gene contains two development-specific promoters. *FEBS Lett.* **214**, 259–264 (1987).
 41. Yoo-Warren, H., Pachnis, V., Ingram, R. S. a Tilghman, S. M. Two regulatory domains flank the mouse H19 gene. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 4707–4715 (1988).
 42. Bell, A. C. a Felsenfeld, G. Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* **405**, 482–485 (2000).
 43. Leighton, P. A., Saam, J. R., Ingram, R. S., Stewart, C. L. a Tilghman, S. M. An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes Dev.* **9**, 2079–2089 (1995).
 44. DeChiara, T. M., Robertson, E. J. a Efstratiadis, A. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* **64**, 849–859 (1991).
 45. Blake, J. A., Baldarelli, R., Kadin, J. A., Richardson, J. E., Smith, C. L. a Bult, C. J. Mouse Genome Database (MGD): Knowledgebase for mouse-human comparative biology. *Nucleic Acids Res.* **49**, D981–D987 (2021).
 46. Leighton, P. A., Ingram, R. S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A. a Tilghman, S. M. Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature* **375**, 34–39 (1995).
 47. Constância, M., Hemberger, M., Hughes, J., Dean, W., Ferguson-Smith, A., Fundele, R., Stewart, F., Kelsey, G., Fowden, A., Sibley, C. a Reik, W. Placental-specific IGF-II is a major modulator of placental and fetal growth. *Nature* **417**, 945–948 (2002).
 48. Moore, T., Constancia, M., Zubair, M., Bailleul, B., Feil, R., Sasaki, H. a Reik, W. Multiple imprinted sense and antisense transcripts, differential methylation and tandem repeats in a putative imprinting control region upstream of mouse Igf2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 12509–12514 (1997).
 49. Soares, M. B., Turken, A., Ishii, D., Mills, L., Episkopou, V., Cotter, S., Zeitlin, S. a Efstratiadis, A. Rat insulin-like growth factor II gene. *J. Mol. Biol.* **192**, 737–752 (1986).
 50. Giannoukakis, N., Deal, C., Paquette, J., Goodyer, C. G. a Polychronakos, C. Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat. Genet.* **4**, 98–101 (1993).
 51. DeChiara, T. M., Efstratiadis, A. a Robertsen, E. J. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* **345**, 78–80 (1990).

52. Curchoe, C., Zhang, S., Bin, Y., Zhang, X., Yang, L., Feng, D., O'Neill, M. a Tian, X. C. Promoter-specific expression of the imprinted IGF2 gene in cattle (*Bos taurus*). *Biol. Reprod.* **73**, 1275–1281 (2005).
53. Lawton, B. R., Sevigny, L., Obergfell, C., Reznick, D., O'Neill, R. J. a O'Neill, M. J. Allelic expression of IGF2 in live-bearing, matrotrophic fishes. *Dev. Genes Evol.* **215**, 207–212 (2005).
54. Sakatani, T., Kaneda, A., Iacobuzio-Donahue, C. A., Carter, M. G., De Boom Witzel, S., Okano, H., Ko, M. S. H., Ohlsson, R., Longo, D. L. a Feinberg, A. P. Loss of imprinting of *Igf2* alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science* **307**, 1976–1978 (2005).
55. Chaillet, J. R., Vogt, T. F., Beier, D. R. a Leder, P. Parental-specific methylation of an imprinted transgene is established during gametogenesis and progressively changes during embryogenesis. *Cell* **66**, 77–83 (1991).
56. Ferguson-Smith, A. C., Sasaki, H., Cattanch, B. M. a Surani, M. A. Parental-origin-specific epigenetic modification of the mouse H19 gene. *Nature* **362**, 751–755 (1993).
57. Rotwein, P. a Hall, L. J. Evolution of insulin-like growth factor II: Characterization of the mouse IGF-II Gene and identification of two pseudo-exons. *DNA Cell Biol.* **9**, 725–735 (1990).
58. Sasaki, H., Jones, P. A., Chaillet, J. R., Ferguson-Smith, A. C., Barton, S. C., Reik, W. a Surani, M. A. Parental imprinting: Potentially active chromatin of the repressed maternal allele of the mouse insulin-like growth factor II (*Igf2*) gene. *Genes Dev.* **6**, 1843–1856 (1992).
59. Zhang, H., Niu, B., Hu, J. F., Ge, S., Wang, H., Li, T., Ling, J., Steelman, B. N., Qian, G. a Hoffman, A. R. Interruption of intrachromosomal looping by CCCTC binding factor decoy proteins abrogates genomic imprinting of human insulin-like growth factor II. *J. Cell Biol.* **193**, 475–487 (2011).
60. Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M. a Tilghman, S. M. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/*Igf2* locus. *Nature* **405**, 486–489 (2000).
61. Murrell, A., Heeson, S. a Reik, W. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and H19 into parent-specific chromatin loops. *Nat. Genet.* **36**, 889–893 (2004).
62. Qiu, X., Vu, T. H., Lu, Q., Ling, J. Q., Li, T., Hou, A., Wang, S. K., Chen, H. L., Hu, J. F. a Hoffman, A. R. A complex deoxyribonucleic acid looping configuration associated

- with the silencing of the maternal Igf2 allele. *Mol. Endocrinol.* **22**, 1476–1488 (2008).
63. Daughaday, W. H., Trivedi, B. a Baxter, R. C. Serum „big insulin-like growth factor II" from patients with tumor hypoglycemia lacks normal E-domain O-linked glycosylation, a possible determinant of normal propeptide processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 5823–5827 (1993).
 64. Duguay, S. J., Jin, Y., Stein, J., Duguay, A. N., Gardner, P. a Steiner, D. F. Post-translational processing of the insulin-like growth factor-2 precursor. Analysis of O-glycosylation and endoproteolysis. *J. Biol. Chem.* **273**, 18443–18451 (1998).
 65. Greenall, S. A., Bentley, J. D., Pearce, L. A., Scoble, J. A., Sparrow, L. G., Bartone, N. A., Xiao, W., Baxter, R. C., Cosgrove, L. J. a Adams, T. E. Biochemical characterization of individual human glycosylated pro-insulin-like growth factor (IGF)-II and big-IGF-II isoforms associated with cancer. *J. Biol. Chem.* **288**, 59–68 (2013).
 66. Buchanan, C. M., Phillips, A. R. J. a Cooper, G. J. S. Preptin derived from proinsulin-like growth factor II (proIGF-II) is secreted from pancreatic islet β -cells and enhances insulin secretion. *Biochem. J.* **360**, 431–439 (2001).
 67. *Livingstone, C. IGF2 and cancer. *Endocr. Relat. Cancer* **20**, 321–339 (2013).
 68. Tooze, S. A., Tooze, J. a Warren, G. Site of addition of N-acetyl-galactosamine to the E1 glycoprotein of mouse hepatitis virus-A59. *J. Cell Biol.* **106**, 1475–1487 (1988).
 69. Qiu, Q., Basak, A., Mbikay, M., Tsang, B. K. a Gruslin, A. Role of pro-IGF-II processing by proprotein convertase 4 in human placental development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 11047–11052 (2005).
 70. *van Doorn, J. Insulin-like growth factor-II and bioactive proteins containing a part of the E-domain of pro-insulin-like growth factor-II. *BioFactors* **46**, 563–578 (2020).
 71. Gowan, L. K., Hampton, B., Hill, D. J., Schlueter, R. J. a Perdue, J. F. Purification and characterization of a unique high molecular weight form of insulin-like growth factor II. *Endocrinology* **121**, 449–458 (1987).
 72. Daughaday, W. H. a Trivedi, B. Measurement of derivatives of proinsulin-like growth factor-II in serum by a radioimmunoassay directed against the E-domain in normal subjects and patients with nonislet cell tumor hypoglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **75**, 110–115 (1992).
 73. Qiu, Q., Yan, X., Bell, M., Di, J., Tsang, B. K. a Gruslin, A. Mature IGF-II prevents the formation of „big" IGF-II/IGFBP-2 complex in the human circulation. *Growth Horm. IGF Res.* **20**, 110–117 (2010).
 74. Hodgkinson, S. C., Davis, S. R., Moore, L. G., Henderson, H. V. a Gluckman, P. D.

- Metabolic clearance of insulin-like growth factor-II in sheep. *J. Endocrinol.* **123**, 461–468 (1989).
75. Bond, J. J., Meka, S. a Baxter, R. C. Binding characteristics of pro-insulin-like growth factor-II from cancer patients: Binary and ternary complex formation with IGF binding proteins-1 to -6. *J. Endocrinol.* **165**, 253–260 (2000).
 76. Baxter, R. C., Martin, J. L. a Beniac, V. A. High molecular weight insulin-like growth factor binding protein complex. Purification and properties of the acid-labile subunit from human serum. *J. Biol. Chem.* **264**, 11843–11848 (1989).
 77. Holthuisen, P. E., Cleutjens, C. B. J. M., Veenstra, G. J. C., van der Lee, F. M., Koonen-Reemst, A. M. C. B. a Sussenbach, J. S. Differential expression of the human, mouse and rat IGF-II genes. *Regul. Pept.* **48**, 77–89 (1993).
 78. Stylianopoulou, F., Herbert, J., Soares, M. B. a Efstratiadis, A. Expression of the insulin-like growth factor II gene in the choroid plexus and the leptomeninges of the adult rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**, 141–145 (1988).
 79. Reinhardt, R. R. a Bondy, C. A. Insulin-like growth factors cross the blood-brain barrier. *Endocrinology* **135**, 1753–1761 (1994).
 80. Chen, D. Y., Stern, S. A., Garcia-Osta, A., Saunier-Rebori, B., Pollonini, G., Bambah-Mukku, D., Blitzer, R. D. a Alberini, C. M. A critical role for IGF-II in memory consolidation and enhancement. *Nature* **469**, 491–497 (2011).
 81. Casellas, A., Mallol, C., Salavert, A., Jimenez, V., Garcia, M., Agudo, J., Obach, M., Haurigot, V., Vilà, L., Molas, M., Lage, R., Morró, M., Casana, E., Ruberte, J. a Bosch, F. Insulin-like growth factor 2 overexpression induces β -cell dysfunction and increases beta-cell susceptibility to damage. *J. Biol. Chem.* **290**, 16772–16785 (2015).
 82. Roche, P., Brown, J., Denley, A., Forbes, B. E., Wallace, J. C., Jones, E. Y. a Esnouf, R. M. Computational model for the IGF-II/IGF2R complex that is predictive of mutational and surface plasmon resonance data. *Proteins Struct. Funct. Genet.* **64**, 758–768 (2006).
 83. *Ghosh, P., Dahms, N. M. a Kornfeld, S. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 202–213 (2003).
 84. Díaz, E. a Pfeffer, S. R. Tip47: A cargo selection device for mannose 6-phosphate receptor trafficking. *Cell* **93**, 433–443 (1998).
 85. van Doorn, J., Cornelissen, A. J. F. H. a Van Buul-Offers, S. C. Plasma levels of insulin-like growth factor binding protein-4 (IGFBP-4) under normal and pathological conditions. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **54**, 655–664 (2001).
 86. El-Shewy, H. M., Lee, M. H., Obeid, L. M., Jaffa, A. A. a Luttrell, L. M. The insulin-

- like growth factor type 1 and insulin-like growth factor type 2/mannose-6-phosphate receptors independently regulate ERK1/2 activity in HEK293 cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 26150–26157 (2007).
87. Frasca, F., Pandini, G., Scalia, P., Sciacca, L., Mineo, R., Costantino, A., Goldfine, I. D., Belfiore, A. a Vigneri, R. Insulin receptor isoform A, a newly recognized, high-affinity insulin-like growth factor II receptor in fetal and cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3278–3288 (1999).
 88. Burvin, R., LeRoith, D., Harel, H., Zloczower, M., Marbach, M. a Karnieli, E. The effect of acute insulin-like growth factor-II administration on glucose metabolism in the rat. *Growth Horm. IGF Res.* **8**, 205–210 (1998).
 89. Morrione, A., Valentinis, B., Xu, S. -q., Yumet, G., Louvi, A., Efstratiadis, A. a Baserga, R. Insulin-like growth factor II stimulates cell proliferation through the insulin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 3777–3782 (1997).
 90. Nguyen, K. H., Yao, X.-H., Erickson, A. G., Mishra, S. a Nyomba, B. L. G. Glucose intolerance in aging male IGFBP-3 transgenic mice: Differential effects of human igfbp-3 and its mutant IGFBP-3 devoid of IGF binding ability. *Endocrinology* **156**, 462–474 (2015).
 91. *Forbes, B. E., McCarthy, P. a Norton, R. S. Insulin-like growth factor binding proteins: A structural perspective. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **3**, (2012).
 92. Giudice, L. C., Farrell, E. M., Pham, H., Lamson, G. a Rosenfeld, R. G. Insulin-like growth factor binding proteins in maternal serum throughout gestation and in the puerperium: Effects of a pregnancy-associated serum protease activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**, 806–816 (1990).
 93. Baxter, R. C., Holman, S. R., Corbould, A., Stranks, S., Jean Ho, P. a Braund, W. Regulation of the insulin-like growth factors and their binding proteins by glucocorticoid and growth hormone in nonislet cell tumor hypoglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80**, 2700–2708 (1995).
 94. Van Doorn, J., Ringeling, A. M., Shmueli, S. S., Kuijpers, M. C., Hokken-Koelega, A. C. S., Van Buul-Offers, S. C. a Jansen, M. Circulating levels of human insulin-like growth factor binding protein- 6 (IGFBP-6) in health and disease as determined by radioimmunoassay. *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. **50**, 601–609 (1999).
 95. *Varma Shrivastav, S., Bhardwaj, A., Pathak, K. A. a Shrivastav, A. Insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3): Unraveling the role in mediating IGF-independent effects within the cell. *Front Cell Dev Biol.* **8**, 286 (2020).

96. Ueki, I., Ooi, G. T., Tremblay, M. L., Hurst, K. R., Bach, L. A. a Boisclair, Y. R. Inactivation of the acid labile subunit gene in mice results in mild retardation of postnatal growth despite profound disruptions in the circulating insulin-like growth factor system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6868–6873 (2000).
97. *Aydin, S. Three new players in energy regulation: Preptin, adropin and irisin. *Peptides* **56**, 94–110 (2014).
98. Aydin, S., Celik, O., Gurates, B., Sahin, I., Ulas, M., Yilmaz, M., Kalayci, M., Kuloglu, T., Catak, Z., Aksoy, A., Ozercan, I. H. a Kumru, S. Concentrations of preptin, salusins and hepcidins in plasma and milk of lactating women with or without gestational diabetes mellitus. *Peptides* **49**, 123–130 (2013).
99. Chang, A. L.-A. T. The biological characterization of preptin, an incretin-like hormone. Doktorská práce, The University of Auckland (2009).
100. Buchanan, C. M., Peng, Z., Cefre, A. a Sarojini, V. Preptin Analogues: Chemical Synthesis, Secondary Structure and Biological Studies. *Chem. Biol. Drug Des.* **82**, 429–437 (2013).
101. MacArthur, M. W. a Thornton, J. M. Influence of proline residues on protein conformation. *J. Mol. Biol.* **218**, 397–412 (1991).
102. Amso, Z., Kowalczyk, R., Watson, M., Park, Y. E., Callon, K. E., Musson, D. S., Cornish, J. a Brimble, M. A. Structure activity relationship study on the peptide hormone preptin, a novel bone-anabolic agent for the treatment of osteoporosis. *Org. Biomol. Chem.* **14**, 9225–9238 (2016).
103. Cheng, K. C., Li, Y. X., Asakawa, A., Ushikai, M., Kato, I., Sato, Y., Cheng, J. T. a Inui, A. Characterization of preptin-induced insulin secretion in pancreatic β -cells. *J. Endocrinol.* **215**, 43–49 (2012).
104. Yang, G., Li, L., Chen, W., Liu, H., Boden, G. a Li, K. Circulating preptin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Ann. Med.* **41**, 52–56 (2009).
105. Baykus, Y., Gurates, B., Aydin, S., Celik, H., Kavak, B., Aksoy, A., Sahin, I., Deniz, R., Gungor, S., Guzel, S. P. a Minareci, Y. Changes in serum obestatin, preptin and ghrelin in patients with gestational diabetes mellitus. *Clin. Biochem.* **45**, 198–202 (2012).
106. Aslan, M., Celik, O., Karsavuran, N., Celik, N., Dogan, D. G., Botan, E. a Kafkasli, A. Maternal serum and cord blood preptin levels in gestational diabetes mellitus. *J. Perinatol.* **31**, 350–355 (2011).
107. Celik, O., Celik, N., Hascalik, S., Sahin, I., Aydin, S. a Ozerol, E. An appraisal of serum

- preptin levels in PCOS. *Fertil. Steril.* **95**, 314–316 (2011).
108. Mierzwicka, A., Kuliczowska-Plaksej, J., Kolačkov, K. a Bolanowski, M. Preptin in women with polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **34**, 470–475 (2018).
 109. Li, B., Li, Y., Zhang, T., Song, L., Lei, C., Zhao, Y. Y., He, B., Zhao, Y. Y., Yin, B., Jin, X. a Li, T. Preptin is a new predictor of coronary artery calcification. *Clin. Chim. Acta* **485**, 133–138 (2018).
 110. Wang, H., Wang, X., Cao, Y., Han, W., Guo, Y., Yang, G., Zhang, J. a Jiang, P. Association of polymorphisms of preptin, irisin and adropin genes with susceptibility to coronary artery disease and hypertension. *Medicine (Baltimore)*. **99**, e19365 (2020).
 111. Cornish, J., Callon, K. E., Bava, U., Watson, M., Xu, X., Lin, J. M., Chan, V. A., Grey, A. B., Naot, D., Buchanan, C. M., Cooper, G. J. S. a Reid, I. R. Preptin, another peptide product of the pancreatic β -cell, is osteogenic in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* **292**, (2007).
 112. Xiao, C., Li, W., Lu, T., Wang, J. a Han, J. Preptin promotes proliferation and osteogenesis of MC3T3-E1 cells by upregulating β -catenin expression. *IUBMB Life* **71**, 854–862 (2019).
 113. Liu, Y. S., Lu, Y., Liu, W., Xie, H., Luo, X. H., Wu, X. P., Yuan, L. Q. a Liao, E. Y. Connective tissue growth factor is a downstream mediator for preptin-induced proliferation and differentiation in human osteoblasts. *Amino Acids* **38**, 763–769 (2010).
 114. Li, N., Zheng, Y. B., Han, J., Liang, W., Wang, J. Y., Zhou, J. R., Shen, Y. a Zhang, J. Lower circulating preptin levels in male patients with osteoporosis are correlated with bone mineral density and bone formation. *BMC Musculoskelet. Disord.* **14**, 49 (2013).
 115. Buchanan, C. M. a Cooper, G. J. S. Peptide having preptin functionality. *WO 00/78805 A1* (2000).
 116. Cornish, J. a Reid, I. Preptin fragments and methods of use. *US 20070173456 A1* (2007).
 117. Kowalczyk, R., Yang, S. H., Brimble, M. A., Callon, K. E., Watson, M., Park, Y. E. a Cornish, J. Synthesis of truncated analogues of preptin-(1-16), and investigation of their ability to stimulate osteoblast proliferation. *Bioorganic Med. Chem.* **22**, 3565–3572 (2014).